

# **FISIOLOGIA VEGETAL**

Uma abordagem prática em multimídia

Manual do Aluno

Paulo Henrique Pereira Peixoto (Coordenador)

Maiana Reis Pimenta

Luciano Bueno dos Reis

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA

Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica

Ao meu filho Henrique e  
à minha esposa Mara,

Dedico.

# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Autores:

- **Paulo Henrique Pereira Peixoto:** Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), Mestre em Fitotecnia pela UFLA e Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Professor de Fisiologia Vegetal no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora, MG. Desenvolve pesquisas nas áreas de Cultura de Tecidos Vegetais e Ecofisiologia Vegetal. (paulo.peixoto@ufjf.edu.br)
- **Maiana Reis Pimenta:** Licenciada em Ciências Biológicas pela UFJF, Mestre em Fisiologia Vegetal pela UFLA. Professora de Fisiologia Vegetal no Departamento de Botânica da UFJF, em Juiz de Fora, MG. Desenvolve pesquisas nas áreas de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular.
- **Luciano Bueno dos Reis:** Licenciado em Ciências Biológicas pela UFJF, Mestre e Doutor em Fisiologia Vegetal pela UFV. Professor de Fisiologia Vegetal da UFV, em Rio Paranaíba, MG. Desenvolve pesquisas nas áreas de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular.

## Colaboradores:

- **Rodolpho Abrantes Camerini e Silva:** Licenciado em Ciências Biológicas pela UFJF, bolsista de iniciação científica pela FAPEMIG/UFJF e monitor da disciplina Fisiologia Vegetal na UFJF.
- **Cássia Rossany Gomes dos Reis:** Licenciada em Ciências Biológicas pela UFJF e bolsista de iniciação científica pela FAPEMIG/UFJF.
- **Leandro Elias Moraes:** Licenciado em Ciências Biológicas pela UFJF, monitor da disciplina de Fisiologia Vegetal e mestrando em Fisiologia Vegetal na UFV.
- **Cristiano Ferrara de Resende:** Licenciado em Ciências Biológicas pela UFJF e monitor da disciplina Fisiologia Vegetal na UFJF.
- **Virgínia Fernandes Braga:** Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela UFJF e mestranda em Ecologia na UFJF.
- **Paula da Fonseca Pereira:** Graduanda em Ciências Biológicas pela UFJF e monitora da disciplina Fisiologia Vegetal na UFJF.
- **Cristiane Jovelina da Silva:** Graduanda em Ciências Biológicas pela UFJF e monitora da disciplina Fisiologia Vegetal na UFJF.

## Introdução

A Fisiologia Vegetal é a área da Botânica que estuda os fenômenos relacionados ao metabolismo, ao desenvolvimento, aos movimentos e à reprodução dos vegetais. Embora de importância reconhecida, o ensino da Fisiologia Vegetal apresenta deficiências e limitações que, em parte, são decorrentes de características intrínsecas à disciplina, uma vez que essa área do conhecimento botânico aborda temas às vezes abstratos e vias metabólicas relativamente complexas, o que dificulta a exploração desses conteúdos em sala de aula. Uma parcela dessas deficiências é resultante das dificuldades que os professores têm em planejar e montar os conteúdos e da convicção equivocada de que as aulas práticas de Fisiologia Vegetal são obrigatoriamente dispendiosas e de difícil execução, demandando equipamentos sofisticados e complexos.

A importância das aulas práticas de Fisiologia Vegetal para o aprendizado dos alunos é indiscutível, o que evidencia a necessidade de criação de metodologias alternativas para a abordagem desse conteúdo nos Ensinos Médio e Superior, empregando materiais didático-pedagógicos de uso simples e de custo reduzido, acessíveis também às escolas públicas. Buscando superar tais limitações, produzimos este material inovador contendo aulas práticas na área de Fisiologia Vegetal, em multimídia interativa, na forma de DVDs, contendo textos, fotografias, imagens e vozes. A maioria das aulas incluídas nos DVDs não são inéditas, sendo encontradas em diferentes livros e rotineiramente ministradas nos cursos de Fisiologia Vegetal em Universidades de todo o país. Todavia, na forma apresentada, o material poderá ser empregado em salas de aulas utilizando DVDs portáteis, computadores e/ou sistemas de projeção, contribuindo para a elaboração das aulas montadas pelos professores e alunos. Esperamos que o material produzido seja versátil e de fácil utilização, servindo como ferramenta alternativa, acessível, eficiente e útil para a melhoria e revitalização do ensino de Fisiologia Vegetal nos níveis Médio e Superior.

**Palavras-Chave:** Fisiologia Vegetal, ensino de Botânica, recursos multimídia, popularização da Ciência e Tecnologia.

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA

## SUMÁRIO

1 - RESPIRAÇÃO .....	1
Prática 1.1 - Demonstração da Respiração pelo Método do Indicador .....	3
Prática 1.2 - Atividade de Catalase em Tubérculos de Batata.....	6
2 - GERMINAÇÃO.....	8
Prática 2.1 - Atividade Desidrogenativa em Sementes .....	10
Prática 2.2 - Efeitos da Qualidade da Luz na Germinação de Sementes Fotoblásticas.....	12
3 - FOTOSÍNTESE.....	14
Prática 3.1 - Pigmentos Hidrossolúveis e Lipossolúveis em Tecidos Vegetais .....	15
Prática 3.2 - Separação dos Pigmentos Cloroplastídicos por Cromatografia em Papel.....	17
Prática 3.3 - Determinação do Espectro de Absorção dos Pigmentos dos Cloroplastos .....	19
Prática 3.4 - Formação de Poder Redutor em Cloroplastos Isolados (Reação de Hill).....	22
Prática 3.5 - Determinação da Irradiância de Compensação .....	24
Prática 3.6 - Síntese de Amido: Efeitos das Clorofilas e da Luz.....	27
Prática 3.7 - Fatores que Afetam a Fotossíntese em <i>Ceratophyllum</i> sp. ....	29
4 - A ÁGUA EM CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS .....	32
Prática 4.1 - Intensidade de Osmose.....	34
Prática 4.2 - Permeabilidade de Biomembranas a Bases Fracas e a Bases Fortes.....	36
Prática 4.3 - Permeabilidade das Membranas Celulares às Moléculas e Íons .....	38
Prática 4.4 - Determinação do Potencial Osmótico de Tecidos Vegetais pelo Método Plasmolítico .....	40

Prática 4.5 - Determinação do Potencial Hídrico em Tecidos Vegetais pelo Método Densimétrico(Schardakow).....	43
Prática 4.6 - Relações Energéticas da Embebição .....	45
Prática 4.7 - Força Mecânica Causada pela Embebição de Sementes .....	47
5 - ABSORÇÃO, TRANSLOCAÇÃO E PERDA DE ÁGUA PELAS PLANTAS .....	49
Prática 5.1 - Absorção e Perda de Água pelas Plantas .....	51
Prática 5.2 - Recuperação da Turgescência em Ramos Cortados .....	53
Prática 5.3 - Desenvolvimento de Tensões Internas no Xilema .....	55
Prática 5.4 - Gutação .....	57
Prática 5.5 - Construção do Modelo de Fluxo por Pressão no Floema (Modelo de Münch) .....	59
Prática 5.6 - Exsudação de Seiva do Floema .....	61
Prática 5.7 - Difusão dos Gases .....	63
6 - NUTRIÇÃO MINERAL .....	65
Prática 6.1 - Adsorção pela Matriz do Solo .....	67
7 - CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO .....	69
Prática 7.1 - Tropismos e Nastismos .....	71
Prática 7.2 - Atividade Herbicida do 2,4-D .....	73
Prática 7.3 - Efeitos do 2,4-D no Alongamento de Raízes .....	75
Prática 7.4 - Indução de Raízes Adventícias em Estacas .....	77
Prática 7.5 - Polaridade em Plantas.....	79
Prática 7.6 - Dominância Apical.....	81
Prática 7.7 - Efeitos Gerais do Etileno .....	83
Prática 7.8 - Efeitos do GA <sub>3</sub> e do Paclobutrazol sobre o Crescimento das Plantas .....	85
Prática 7.9 - Efeitos da Chuva Ácida em Plantas .....	87
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA

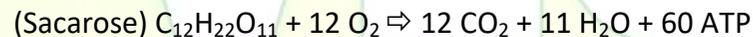
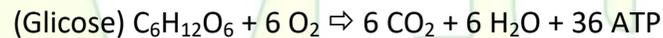


# 1 - RESPIRAÇÃO

A respiração promove a liberação controlada da energia armazenada em moléculas orgânicas reduzidas. A energia química produzida ou liberada pela oxidação de diferentes substratos possibilita a formação do ATP, nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia no metabolismo.

Os substratos respiratórios são armazenados nas plantas na forma de carboidratos, especialmente amido, sacarose e hemicelulose. Outra fonte de energia são os lipídeos, particularmente os óleos (triglicerídeos). Eventualmente, outras substâncias, como os ácidos orgânicos e os aminoácidos, também são utilizadas. Todas as moléculas orgânicas têm origem na fotossíntese e a respiração é um processo que apenas libera a energia química previamente armazenada pela transformação da energia eletromagnética da luz.

As equações a seguir resumem o processo de respiração aeróbia, tendo como substratos a glicose ou a sacarose:



Na respiração, moléculas de glicose ou de sacarose são oxidadas. Nas reações, átomos de hidrogênio são removidos e posteriormente combinados com o oxigênio que, por sua vez, é reduzido a água. Durante o processo, os elétrons vão de níveis mais altos de energia para níveis mais baixos, liberando, assim, energia para a produção de ATP. Parte da energia química produzida é dissipada como energia térmica, gerando aquecimento no organismo. Além da respiração aeróbia, cujo rendimento energético é maior, a respiração celular também pode ocorrer em ausência de oxigênio.

A degradação da molécula de glicose na respiração é fundamentalmente um processo de oxirredução. Enzimas do grupo das oxirredutases, incluindo principalmente desidrogenases e oxigenases, atuam em diversos passos da sequência degradativa. A respiração aeróbia é um dos ciclos mais importantes do metabolismo primário. Ela envolve três etapas distintas: a glicólise, o Ciclo de Krebs e a Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE).

A glicólise, primeira etapa da respiração, é um processo oxidativo tipicamente citoplasmático e que não depende diretamente do oxigênio. A glicólise apresenta como produtos vários intermediários e um saldo energético de apenas 2 moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose oxidada. Ao final da glicólise, os produtos formados podem apresentar diferentes funções dependendo das necessidades metabólicas e, principalmente, da disponibilidade de oxigênio ( $O_2$ ) no meio. Na atmosfera terrestre, a concentração de  $O_2$  encontra-se próxima a 21%. Todavia, nos ambientes aquáticos e no solo, essa concentração é menor. Quando a concentração de oxigênio fica entre 2-3% (hipoxia) ou cai a 0% (anoxia), o processo respiratório normal, envolvendo o Ciclo de Krebs e a CTE, é interrompido, passando a respiração a ser restrita à glicólise, ativando o metabolismo fermentativo.

A fermentação é um mecanismo ineficiente para as plantas, uma vez que o número de moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose oxidada cai de 36 para apenas 2. Além disso, o processo gera substâncias tóxicas para o metabolismo celular, o que causa senescência e morte dos tecidos afetados em indivíduos não adaptados aos ambientes com baixas tensões ou privados de oxigênio. No processo fermentativo, as moléculas de piruvato são transformadas em lactato (fermentação láctica) ou em acetaldeído, através de uma reação química que libera  $CO_2$ . O acetaldeído é, então, convertido em etanol (fermentação alcoólica). Em plantas, a fermentação alcoólica é mais comum que a láctica. Tanto o lactato quanto o etanol são tóxicos para as células, devendo ser rapidamente eliminados para não causarem danos ao metabolismo. As plantas evitam a anoxia/hipoxia pelo

desenvolvimento de adaptações morfológicas típicas, como aerênquimas, pneumatóforos e/ou lenticelas.

Na glicólise, a oxidação da glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) é incompleta e resulta na produção de NADH, ATP e piruvato ( $C_3H_4O_3$ ). O piruvato é uma molécula reduzida e que ainda apresenta grande quantidade de energia livre em suas ligações químicas. A oxidação completa da glicose envolve a transferência do piruvato para a matriz mitocondrial. O piruvato, no interior das mitocôndrias, é oxidado em uma série de reações bioquímicas denominadas Ciclo de Krebs, em homenagem ao cientista alemão Hans Adolf Krebs que, em 1937, elucidou o Ciclo do Ácido Cítrico, também conhecido como Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

Cada molécula de piruvato oxidada no Ciclo de Krebs gera três moléculas de  $CO_2$  (local de produção desse gás na respiração aeróbia) e uma de ATP. Os elétrons liberados nas reações oxidativas são utilizados para produzir moléculas de NADH e  $FADH_2$ . Em todas as reações onde ocorre a síntese dessas moléculas, enzimas desidrogenases estão envolvidas (piruvato desidrogenase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase, oxoglutarato desidrogenase, etc). O NADH é o principal agente redutor (fonte de elétrons) da cadeia de transporte de elétrons (CTE) da respiração. Como ao final da glicólise são produzidas duas moléculas de piruvato, o Ciclo de Krebs precisa dar duas voltas para a oxidação completa da glicose, gerando  $CO_2$ . Portanto, todos os produtos desse ciclo são formados em dobro (6 moléculas de  $CO_2$ , 8 moléculas de NADH, 2 moléculas de  $FADH_2$  e 2 moléculas de ATP).

Na CTE, os elétrons são transportados através de pelo menos quatro complexos protéicos, resultando no lançamento de prótons ( $H^+$ ) para o espaço intermembranas e na formação do gradiente de potencial eletroquímico (força próton-motora) utilizado para a síntese de ATP. O ATP é produzido quando os  $H^+$  retornam à matriz mitocondrial através de um complexo proteico denominado ATP-sintase, o que foi previsto, em 1961, por Peter Mitchell na Teoria Quimiosmótica. Uma molécula de ATP é produzida para cada  $3H^+$  que retornam à matriz mitocondrial.

Além dos quatro complexos protéicos, as mitocôndrias vegetais também apresentam, pelo menos, mais quatro proteínas adicionais que atuam transferindo elétrons até o oxigênio. Estudos recentes comprovaram que as mitocôndrias vegetais apresentam uma via auxiliar para o fluxo de elétrons, denominada oxidase alternativa (AOX), que consegue receber elétrons sem passar por complexos protéicos inibidos por cianeto, mantendo o fluxo de elétrons até o  $O_2$  e formando  $H_2O$ . Essa via tem importância adaptativa, relacionando-se ao aquecimento das plantas ou de porções destas, permitindo o aumento da temperatura em climas frios e a liberação de odores atrativos para polinizadores.

A análise do rendimento da respiração aeróbia evidencia que são produzidas 36 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada. Comparativamente ao que foi observado para a fermentação, cujo saldo energético é de apenas 2 moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada, tem-se um rendimento 18 vezes maior para a respiração aeróbia. Este fato foi observado por Louis Pasteur em estudos utilizando microorganismos anaeróbios facultativos. Ele percebeu que quando os microorganismos eram cultivados em ausência de oxigênio, o consumo de glicose era maior do que sob condições aeróbias, fenômeno denominado “efeito Pasteur”.

## Prática 1.1 - Demonstração da Respiração pelo Método do Indicador

### Introdução

A respiração promove a liberação controlada da energia armazenada em moléculas orgânicas reduzidas. Todas as moléculas orgânicas têm, em última análise, origem na fotossíntese e a respiração é um processo que apenas libera a energia química previamente armazenada pela transformação da energia eletromagnética da luz.

Nos processos fotossintéticos e respiratórios ocorrem trocas gasosas com o meio. Além da respiração aeróbia, cujo rendimento energético é maior, a respiração celular também pode ocorrer em ausência de oxigênio. Na respiração aeróbia há consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico, enquanto que, na fermentação, não há consumo de oxigênio, mas pode haver a liberação de gás carbônico (fermentação alcoólica). O CO<sub>2</sub> em presença de água forma ácido carbônico. Portanto, num sistema fechado, a respiração acidifica a fase aquosa (H<sup>+</sup>), uma vez que se estabelece um equilíbrio entre as fases gasosas e líquidas, conforme a equação a seguir:



Se a fase aquosa contiver um indicador de pH, as variações na quantidade de CO<sub>2</sub> no ar podem ser detectadas pelas mudanças na sua coloração. O azul de bromotimol é um indicador de pH que se apresenta verde em meio neutro, azul em meio básico e amarelo em meio ácido e pode, portanto, ser usado para se observar a acidificação de uma fase aquosa por CO<sub>2</sub> proveniente da respiração.

### Objetivos

Demonstrar a ocorrência de atividade respiratória em diferentes materiais biológicos. Demonstrar a importância do oxigênio para a sobrevivência das plantas em ambientes alagados.

### Materiais

- Fermento para pão (levedo)
- Sacarose (açúcar cristal)
- Folhas recém-coletadas
- Suporte de plástico
- Sementes de feijão embebidas e secas
- Solução de azul de bromotimol (100 mg de azul de bromotimol + 16 mL de NaOH 0,01 N; completar para 250 mL com água)
- Nove tubos de ensaio grandes (2,5 x 12,5 cm)
- Quatro tubos de ensaio pequenos (1,0 x 8,0 cm)
- Papel-alumínio
- Rolhas de borracha
- Conta gotas
- Adoçante dietético
- HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N

### Procedimentos

Enumere 9 tubos de ensaio (2,5 x 12,5 cm) e adicione 5 gotas de azul de bromotimol em cada. Coloque no fundo dos tubos um pequeno suporte de metal ou plástico, utilizado para manter suspensos os tubos de ensaio pequenos, que conterão os diferentes materiais biológicos a serem investigados. Acima do suporte, coloque o tubo pequeno (1,0 x 8,0 cm) com os diferentes materiais. Proceda da seguinte forma:

**Tubo 1** - Padrão. Servirá como referência da coloração inicial do indicador;

**Tubo 2** - Adicione até a metade do tubo pequeno suspensão de fermento + sacarose (5 g de fermento + 5 g de sacarose em 25 mL de água);

**Tubo 3** - Adicione até a metade do tubo pequeno suspensão de fermento em água (5 g de fermento em 25 mL de água);

**Tubo 4** - Adicione até a metade do tubo pequeno suspensão fervida de fermento em água (5 g de fermento em 25 mL de água);

**Tubo 5** - Adicione até a metade do tubo pequeno suspensão de fermento em água + adoçante dietético (5g de fermento + 20 gotas de adoçante dietético em 25 mL de água);

**Tubo 6** - Adicione dez sementes embebidas de feijão;

**Tubo 7** - Adicione dez sementes “secas” de feijão;

**Tubo 8** - Coloque uma folha recém-coletada acima do indicador. Mantenha este tubo próximo a uma fonte de luz.

**Tubo 9** - Coloque outra folha recém-coletada acima do indicador. Este tubo de ensaio será enrolado em papel-alumínio ou transferido para o escuro.

Assim que todos os tratamentos estiverem prontos, vede hermeticamente todos os tubos. Aguarde cerca de uma hora. Acompanhe a mudança de cor do indicador, anotando as observações baseadas em um sistema de convenção para as variações de cor da solução indicadora.

Enquanto se espera o tempo necessário às observações, podem-se realizar os seguintes testes:

**Teste 1:** Adicione 4 gotas do indicador em um tubo de ensaio e acrescente uma gota de HCl 0,1 N. Observe e interprete os resultados. Em seguida, adicione ao mesmo tubo NaOH 0,1 N, gota a gota, até que haja mudança de cor. Observe e interprete os resultados.

**Teste 2:** Adicione 4 gotas do indicador em um tubo de ensaio. Acrescente algumas gotas de água contendo gás carbônico (água mineral gasosa), até que haja mudança de cor. Observe e interprete os resultados. Faça o mesmo procedimento com água mineral não gasosa, de torneira ou filtrada. Observe e interprete os resultados.

**Teste 3:** Adicione 10 gotas do indicador em um tubo de ensaio. Através de uma pipeta de 10 mL, assopre vigorosamente de forma que o ar circule na solução. Observe e interprete os resultados.

### Questionário

1. O que é o azul de bromotimol?
2. Comparando os resultados dos testes 1 e 2, o que acontece ao CO<sub>2</sub> quando dissolvido em água?
3. Explique o resultado do teste 3.
4. O que havia em comum nos tubos onde ocorreram mudanças na coloração do indicador de pH?
5. Compare e explique os resultados obtidos nos tubos 2 a 9.
6. Para demonstrar a respiração em folhas, foi necessário cobrir o tubo de ensaio com papel alumínio. Por quê?
7. Em ambientes naturais, as plantas terrestres e as aquáticas podem ser submetidas a condições de anoxia/hipoxia? Quais seriam as consequências para elas da permanência nessas condições?

8. Quais estruturas morfológicas e/ou adaptações metabólicas as plantas possuem para evitar e/ou tolerar as condições de anoxia/hipoxia?

9. Por que águas contendo plantas subaquáticas são, em geral, mais ácidas à noite do que durante o dia?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 1.2 - Atividade de Catalase em Tubérculos de Batata

### Introdução

Na respiração aeróbia, elétrons do NAD(P)H e do FADH<sub>2</sub> são transferidos para o O<sub>2</sub> em resposta ao funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (CTE). O funcionamento da CTE também cria condições para o transporte de prótons (H<sup>+</sup>) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente de potencial eletroquímico que, durante a sua dissipação, fornece energia motriz para a síntese do ATP (força próton-motora).

Todavia, espécies reativas de oxigênio e radicais livres também são geradas durante a respiração. A formação dos radicais livres ocorre porque o oxigênio pode receber elétrons de diferentes moléculas. Durante o funcionamento da CTE, duas rotas distintas podem operar: a rota oxidativa, que consiste na formação de água após o O<sub>2</sub> receber elétrons da cadeia respiratória (acoplada à fosforilação oxidativa com a formação de ATP); e a rota oxigenativa, na qual o oxigênio forma espécies reativas de oxigênio (EROs).

Quando o O<sub>2</sub> recebe elétrons (e<sup>-</sup>) pode ocorrer a formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um potente inibidor de muitas enzimas. Para não comprometer o metabolismo, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser rapidamente eliminado através da ação de diferentes enzimas. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é substrato da catalase, enzima que promove a transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (molécula de baixa reatividade).



O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em presença de íons ferro (Fe<sup>2+</sup>), pode originar o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), espécie química altamente reativa e que causa danos a

diversas moléculas celulares, inclusive ao DNA, podendo provocar mutações. A ação conjunta da catalase e de outras enzimas antioxidativas é de fundamental importância para a proteção do metabolismo respiratório aeróbio.

### Objetivos

Observar, *in situ*, a atividade de catalase em tubérculos de batata.

### Materiais

- Água oxigenada 20 volumes
- Placas de Petri
- Tubérculos de batata inglesa

### Procedimentos

Corte fatias transversais de tubérculos de batata com aproximadamente 1 cm de espessura. Coloque as fatias em placas de Petri, cobrindo-as com solução diluída (30:1) de peróxido de hidrogênio (ou água oxigenada 20 volumes). O desprendimento de bolhas de oxigênio (formação de espuma) indica a presença da enzima catalase. Repita o mesmo procedimento com fatias de tubérculos de batata previamente fervidas por 5 minutos. Anote e interprete os resultados.

### Questionário

1. Apresente a reação das catalases, indicando o substrato e os produtos.
2. Cobrindo as fatias de batata com água oxigenada, observou-se maior evolução de bolhas de oxigênio nos tecidos da periferia do que nos tecidos internos. Por quê?

3. Que diferenças existem entre catalases, peroxidases e desidrogenases quanto às reações que elas catalisam?

4. Explique as diferenças entre enzimas “preexistentes” e enzimas sintetizadas “*de novo*”. A que grupo as catalases pertencem?

5. Durante o processo respiratório, como são formados os radicais livres? Como eles são eliminados do metabolismo?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## 2 - GERMINAÇÃO

As sementes possibilitam a conservação e perpetuação das espécies em diferentes condições ambientais, muitas vezes em situações nas quais a planta, após a germinação, não sobreviveria. As sementes, em estado de latência (quiescência) ou mesmo de dormência, apresentam taxas respiratórias reduzidas. Após a reidratação (embebição), caso a semente não apresente dormência, a taxa respiratória aumenta, ativando o processo germinativo. Nessa etapa, as reservas de amido, lipídios e proteínas são quebradas pela ação de uma série de enzimas que atuam de forma conjunta, aumentando a transformação dessas substâncias em carboidratos solúveis (açúcares), substratos imediatos do processo respiratório. Durante a embebição, há um aumento na respiração e na produção de giberelinas nos tecidos do embrião e em outras partes das sementes. Nos cereais, as giberelinas ativam a síntese *de novo* de enzimas hidrolíticas, utilizando como substratos aminoácidos armazenados na camada de aleurona.

As sementes, quando recém-colhidas, nem sempre germinam de imediato. Algumas delas passam, logo após a dispersão, por um período de dormência, que se caracteriza pela incapacidade de germinação, mesmo que as principais condições ambientais ativadoras do processo estejam disponíveis. A dormência difere da quiescência, fenômeno que se caracteriza pela não germinação das sementes em decorrência da ausência de algum sinal ambiental necessário a sua ativação. A ocorrência de dormência em sementes tem caráter adaptativo, uma vez que ela geralmente evita a germinação sob condições adversas para as plântulas. A dormência é comum em espécies não domesticadas, sendo, entretanto, inadequada para sementes de espécies cultivadas (agrícolas), que são selecionadas para germinarem rapidamente quando expostas a condições ambientais favoráveis.

A dormência primária, geneticamente controlada, é decorrente de mecanismos que evitam a germinação em condições desfavoráveis ou

que prolongam o tempo necessário à germinação, aumentando a possibilidade de dispersão e, conseqüentemente, reduzindo a competição intra-específica. Os principais tipos de dormência primária são causados pela casca (tegumento), associados ao embrião ou devido a ambos. A escarificação é o procedimento utilizado para eliminar a dormência tegumentar, podendo ser realizada pelo tratamento das sementes com ácidos (escarificação química), água quente (escarificação térmica), impactos e lixas (escarificação mecânica), etc., fazendo com que o material que compõe a estrutura do tegumento seja enfraquecido, arranhado e/ou quebrado, facilitando a embebição e o posterior lançamento da radícula ou da parte aérea.

A dormência embrionária pode ser atribuída a causas ligadas ao embrião ou às porções localizadas internamente ao tegumento da semente, principalmente relacionadas ao endosperma. Algumas espécies apresentam concentrações elevadas de substâncias inibidoras de germinação, como o HCN (espécies de Rosaceae), além de acumularem substâncias solúveis, como os fenóis e cumarinas, e fitormônios, como o etileno (espécies dos Cerrados) e, principalmente, ácido abscísico (ABA). O período de dormência também parece estar associado à necessidade de desidratação das sementes ortodoxas, cuja capacidade de germinação aumenta quando a umidade é reduzida. Além disso, a dormência também evita a germinação das sementes ainda dentro dos frutos, fato associado, principalmente, aos baixos níveis de ácido abscísico nas sementes.

Em algumas espécies, é o embrião que efetivamente encontra-se em dormência, o que geralmente está associado ao seu desenvolvimento incompleto (embrião mal-formado). Esse fato é comum em espécies que apresentam crescimento rápido de frutos, como, por exemplo, em pessegueiro, cujas sementes exigem a prática da estratificação, processo que consiste na manutenção das sementes (amêndoas) sob refrigeração, em temperaturas baixas (7-10°C), até que o embrião complete o seu desenvolvimento, o que ocorre entre 15-30 dias. Posteriormente, as sementes são colocadas para germinar em temperaturas mais elevadas

(acima de 20°C), indicando que as baixas temperaturas da estratificação diferem das ideais para a germinação.

O fotoblastismo é a área do conhecimento botânico que estuda os efeitos da luz sobre a germinação das sementes. As sementes que germinam somente em presença de luz são classificadas como fotoblásticas positivas, enquanto que aquelas que germinam somente no escuro são denominadas fotoblásticas negativas. Existem, ainda, sementes fotoblásticas neutras (não-fotoblásticas), que germinam tanto na presença de luz quanto no escuro. Esse fenômeno é explicado pela participação do fitocromo. Moléculas desse pigmento são encontradas em todos os órgãos da planta.

O fitocromo é uma cromoproteína que se apresenta sob duas formas fotorreversíveis. Em plantas estioladas, o fitocromo encontra-se presente na forma que absorve a luz vermelha, denominada Fv. Esta é a forma de fitocromo sintetizada pelas plantas no escuro. A forma Fv, que é azul, é convertida pela luz vermelha (V) para a forma que absorve luz vermelho-longo, denominada F<sub>VL</sub>, que, por sua vez, é azul-esverdeada. A forma F<sub>VL</sub> pode ser convertida de volta para a forma Fv pela ação da luz vermelho-longo (VL). Esta fotorreversibilidade é a propriedade mais importante do fitocromo. Embora as duas formas de fitocromo sejam referidas pelos seus picos máximos de absorção no vermelho (V) ou no vermelho-longo (VL), os espectros de absorção das formas Fv e F<sub>VL</sub> se sobrepõem significativamente na região do vermelho, sendo que a forma Fv também absorve uma pequena quantidade de luz na região do VL. Em função disso, há um equilíbrio dinâmico entre as duas formas de fitocromo. Desse modo, a proporção de fitocromo na forma F<sub>VL</sub>, após a saturação da irradiação com luz V, é de apenas 85% e não de 100% como seria esperado caso os espectros não sofressem sobreposições. De modo similar, uma pequena quantidade da luz V absorvida pela forma F<sub>VL</sub> torna impossível a conversão de todo o F<sub>VL</sub> para a forma Fv em resposta à aplicação de um espectro amplo de luz VL. Ao invés disso, um equilíbrio de 97% de Fv e de 3% de F<sub>VL</sub> é obtido. A proporção entre as formas ativas

e inativas após saturação com luz V ou VL é denominada estado fotoestacionário.

Algumas espécies domesticadas e um grande número de espécies selvagens apresentam o fenômeno de fotoblastismo, o que para muitas delas está relacionado à proteção contra a germinação em ambientes escuros ou sombreados, fatores que limitam a fotossíntese. A ação do fitocromo é especializada, uma vez que esse pigmento consegue “detectar” não apenas a presença de luz (intensidade), mas, principalmente, a qualidade da radiação que chega ao ambiente onde as sementes se encontram. Tal fato explica, por exemplo, o aparecimento de espécies vegetais não observadas previamente após a realização de preparos do solo para plantios (aragem/gradagem) e de posteriormente aos desmatamentos, que, respectivamente, expõem sementes soterradas e altera a qualidade espectral incidente sobre as sementes.

A capacidade germinativa das sementes varia em função do vigor, característica que expressa a capacidade e os atributos fisiológicos responsáveis pela germinação das sementes em percentuais próximos aos obtidos logo após a dispersão. Essa capacidade reduz com o passar do tempo, mas é influenciada pelas condições de armazenamento. A longevidade das sementes está intimamente relacionada à manutenção do vigor. Existem relatos de sementes germinando após mais de 150 anos em materiais mantidos em herbários, bem como casos ainda mais espetaculares, envolvendo a germinação de sementes encontradas em catacumbas de faraós e soterradas em regiões turfosas. Nesses diferentes ambientes, uma característica comum é a manutenção quase constante das condições de UR e de temperatura, o que reduz a atividade metabólica e impede a germinação.

## Prática 2.1 - Atividade Desidrogenativa em Sementes

### Introdução

A avaliação da viabilidade das sementes é um procedimento importante em estudos relacionados à reprodução sexuada. Testes que fornecem resultados rápidos vêm sendo utilizados para a tomada de decisões nas diferentes etapas da produção e na análise da viabilidade e da germinabilidade das sementes.

As desidrogenases são enzimas oxidorreduzases catalisadoras da transferência de íons hidrogênio e de um par de elétrons de um substrato reduzido, que é oxidado na reação, para uma molécula receptora de elétrons que, por sua vez, torna-se reduzida. A respiração aeróbia envolve a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons (CTE). As desidrogenases participam de reações em todas essas etapas. Por exemplo, na glicólise, a *gliceraldeído-3-P-desidrogenase* promove a conversão do gliceraldeído-3-P em 1,3-bifosfoglicerato. As *piruvato*, *isocitrato*, *α-cetoglutarato*, *succinato* e *malato desidrogenases*, atuam em diferentes reações do Ciclo de Krebs. Por sua vez, a *NADH-desidrogenase*, também denominada Complexo I, e a *NADH-quinona oxidorreduzase*, participam da cadeia respiratória. As atividades das desidrogenases são indicadores importantes da viabilidade de sementes.

Alguns corantes podem agir como aceptores de hidrogênio, mudando de cor com a sua redução. Por exemplo, sais de tetrazólio são incolores (ou amarelos) e solúveis quando oxidados e produzem sais de trifênil-formazana, insolúveis e vermelhos, quando reduzidos. Com o uso de sais de tetrazólio, é possível verificar “*in situ*” a atividade de desidrogenases, uma vez que as formazanas precipitam-se onde estas ocorrem. A presença de desidrogenases ativas é considerada sinal de vitalidade do tecido vegetal.

As desidrogenases catalisam reações do tipo:



Sais de tetrazólio têm sido recomendados para a realização de testes rápidos de viabilidade e de germinabilidade de sementes. O teste do tetrazólio é um procedimento rápido e de grande importância para a avaliação da qualidade das sementes, porque, além de indicar a vitalidade, o mesmo também pode fornecer informações sobre o vigor e ainda identificar problemas fitossanitários, além de detectar a ocorrência de danos mecânicos que podem comprometer a germinabilidade das sementes. Todavia, para a utilização do teste do tetrazólio, torna-se necessário o estabelecimento de padrões de coloração para cada espécie avaliada, o que envolve estudos prévios da morfologia interna das sementes e testes de germinação em campo, para que os padrões estabelecidos nos laboratórios se tornem precisos.

### Objetivos

Determinar a ocorrência e a localização da atividade de desidrogenases em sementes de milho e de feijão, além de avaliar a aplicabilidade do teste do tetrazólio para estimar o vigor das sementes dessas espécies.

### Materiais

- Grãos de milho e de feijão embebidos por 12 a 24 horas.
- Solução de tetrazólio (cloreto de trifêniltetrazólio) a 1% (p/v)
- Banho-maria
- Tubos de ensaio (2,5 x 12,5 cm)
- Estilete ou lâmina de barbear nova

## Procedimentos

Separe 10 grãos de milho e de feijão, embebidos de véspera, e deixe-os em água fervente por 5 minutos. Com um estilete ou com uma lâmina de barbear nova, corte cada grão de milho longitudinalmente, num plano perpendicular às faces achatadas, expondo o eixo maior do embrião. Faça o mesmo procedimento com as sementes de feijão, cortando-as longitudinalmente, a partir do hilo, separando os dois cotilédones. Faça o mesmo tipo de corte em outros lotes de grãos embebidos de milho e de feijão, mas que não tenham sido fervidos. Conserve os quatro grupos em tubos de ensaio separados e identificados.

Adicione aos tubos de ensaio contendo os grãos cortados solução de cloreto de trifeniltetrazólio a 1%, em quantidade suficiente para cobrir os grãos. Transfira os tubos de ensaio para banho-maria para acelerar a reação. Observe as mudanças de cor que ocorrem com o tempo (20 a 30 minutos). Faça um esquema da distribuição da coloração vermelha nos grãos vivos.

## Questionário

1. O teste do tetrazólio (TTZ) é específico para determinar a atividade de que tipo de enzima?
2. Por que o teste do TTZ pode ser usado para indicar a vitalidade de sementes?
3. Em quais regiões da semente aparecem a coloração vermelha?
4. Descreva a reação que leva ao aparecimento da coloração vermelha nos tecidos das sementes.

5. As zonas meristemáticas de raízes vivas apresentam reação positiva ao teste do TTZ e partes suberosas de raízes velhas dão resultado negativo ao mesmo tipo de teste. Explique.

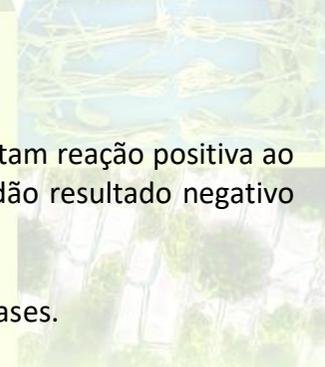
6. Apresente a denominação de quatro desidrogenases.

7. Escreva a equação geral para a ação de uma desidrogenase.

8. Qual é a importância das desidrogenases no processo respiratório?

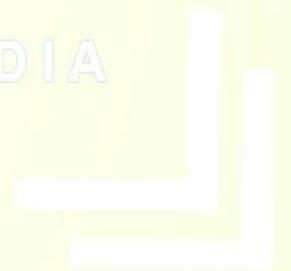
9. Por que a utilização do teste do tetrazólio para espécies ainda não domesticadas exige o estabelecimento de padrões?

10. No que diferem os processos de germinação, considerando critérios biológicos e critérios agrônômicos?



LOGIA  
VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 2.2 - Efeitos da Qualidade da Luz na Germinação de Sementes Fotoblásticas

### Introdução

Após a dispersão, as sementes tornam-se independentes da planta-mãe e encontram-se prontas para germinar, o que acontece caso elas não apresentem dormência e estejam em ambientes cujas condições de temperatura, água, luminosidade e disponibilidade de oxigênio, entre outros, sejam adequadas. Quando recém-colhidas, as sementes de algumas espécies somente germinam em presença de luz. Todavia, essa exigência vai desaparecendo à medida que elas envelhecem.

Determinadas faixas da radiação visível são mais eficientes do que outras na indução da germinação e devem, portanto, ser captadas por um pigmento fotorreceptor. Um desses pigmentos, o fitocromo, é constituído de um cromóforo tetrapirrólico de cadeia aberta associado a uma proteína, apresentando-se sob duas formas fotorreversíveis: o fitocromo vermelho (**F<sub>v</sub>**), forma naturalmente sintetizada nas sementes, que apresenta máxima absorção na faixa do vermelho (660 nm), e o fitocromo-vermelho-longo (**F<sub>VL</sub>**), com máxima absorção na faixa do vermelho-longo (730 nm). Quando o **F<sub>v</sub>** absorve radiação na faixa do vermelho ele se transforma rapidamente na forma **F<sub>VL</sub>**. Por sua vez, quando a forma **F<sub>VL</sub>** recebe luz vermelho-longo, ela retorna rapidamente à forma **F<sub>v</sub>**. As interconversões entre as formas dos fitocromos são produtos de reações luminosas de baixa energia, diferentemente de outros fenômenos fisiológicos que requerem alta energia. A proporção entre as formas **F<sub>VL</sub>**/**F<sub>v</sub>** é resultante das condições de luminosidade no ambiente. Quando a germinação ocorre em resposta a valores elevados da relação **F<sub>VL</sub>**/**F<sub>v</sub>**, as sementes são classificadas como fotoblásticas positivas. As sementes que germinam apenas no escuro são consideradas fotoblásticas negativas, embora muitas sementes germinem independentemente da qualidade da radiação luminosa (sementes não

fotoblásticas). Após a absorção da radiação pelo fitocromo, uma série de reações é desencadeada, afetando o processo germinativo.

As giberelinas são hormônios vegetais associados à germinação das sementes de diferentes espécies. Em sementes fotoblásticas positivas mantidas em condições de escuridão, o fornecimento exógeno de giberelinas pode estimular a germinação. Tal fato sugere que a germinação nas sementes fotoblásticas positivas exige a conversão do fitocromo da forma **F<sub>v</sub>** para a forma **F<sub>VL</sub>**, o que ocorre em resposta à luz vermelha, antes mesmo da síntese das giberelinas, hormônios que atuam no estímulo à produção das enzimas hidrolíticas utilizadas na quebra das reservas.

Além da germinação das sementes, diversos fenômenos fotomorfogênicos como a floração, o crescimento de entrenós, o desenvolvimento normal das plântulas, a síntese de pigmentos, a abertura e o fechamento de folhas, dentre outros, são controlados pelo sistema fitocromo.

### Objetivos

Verificar a influência de diferentes faixas de radiação do espectro luminoso sobre a germinação de sementes. Avaliar a influência do GA<sub>3</sub> sobre a germinação de sementes fotoblásticas.

### Materiais

- Sementes de fumo e de alface
- Caixas gerbox ou placas de Petri (10 cm de diâmetro)
- Papel filtro
- Caixas de papel com tampas forradas de papel celofane ou acrílico nas cores azul, verde, vermelho e vermelho-longo
- Solução de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 50 µM (Preparar 150 mL ⇒ V x 300 µL = 150 mL x 50 µL ⇒ V = 25 mL de GA<sub>3</sub> + 125 ml de água)

## Procedimentos

Identifique os recipientes (caixas gerbox ou placas de Petri), com as respectivas cores, forrando o seu fundo com uma folha de papel filtro. Em cada um dos recipientes, adicione uma mesma quantidade de sementes de fumo ou de alface sobre o papel filtro. Em seguida, adicione 10 mL de água destilada ou de GA<sub>3</sub> (50 µM) a cada recipiente.

Cuidadosamente, coloque os recipientes em caixas cobertas com filtros referentes a cada uma das seguintes cores: acrílico azul intenso ou duas folhas de papel celofane azul intenso, que transmitem entre 390-590 nm, na faixa do violeta-azul; acrílico verde intenso ou quatro folhas de papel celofane verde intenso, que transmitem entre 480-630 nm, com pico no verde; acrílico vermelho intenso ou quatro folhas de papel celofane vermelho intenso, que transmitem entre 580-680 nm, com pico no vermelho; acrílico azul intenso + acrílico vermelho intenso ou duas folhas de papel celofane azul intenso + duas folhas de papel celofane vermelho intenso, que transmitem acima de 670 nm, no vermelho-longo. Embrulhe uma caixa em papel alumínio ou coloque-a em um local escuro. Deixe uma caixa com os recipientes exposta à luminosidade ambiente ou à luz fluorescente branca. Exponha as caixas com os filtros a um banco de luz fluorescente ou à luminosidade de uma janela.

Faça monitoramento diário da umidade do papel que forra as placas, evitando que o mesmo seque. Após uma ou duas semanas observe a germinação das sementes, considerando a protrusão das radículas nos diferentes tratamentos. Estime a porcentagem de germinação em cada faixa do espectro de radiação luminosa aos quais as sementes foram submetidas.

## Questionário

1. Qual é o pigmento envolvido na germinação das sementes e quais são os comprimentos de onda mais efetivos para ativação desse processo?

2. Por que as sementes das espécies estudadas (fumo, alface, etc.) praticamente não germinaram no escuro?

3. Explique de que maneira a luz pode desencadear a germinação de sementes fotoblásticas positivas.

4. Algum fitormônio pode substituir a luz na germinação de sementes fotoblásticas positivas?

5. Se as sementes forem colocadas para germinar em total obscuridade e se essa condição for interrompida com lampejo de luz vermelha, o que acontecerá? E se o lampejo for com luz vermelho-distante?

6. Quais espécies de interesse comercial apresentam sementes fotoblásticas positivas?

7. Como a preparação do solo poderia aumentar a quantidade de ervas daninhas, considerando os resultados da aula? Que alternativa à aração você sugere para evitar o aparecimento de ervas daninhas?

8. Como se explica o estabelecimento de novas espécies em uma área formada após a abertura de uma clareira em uma floresta? Quais espécies predominavam no sub-bosque antes da abertura da clareira e quais espécies predominarão posteriormente a sua realização?

9. Qual é a importância ecológica e quais são os hábitos predominantes em espécies que possuem sementes fotoblásticas positivas e negativas?

### 3 - FOTOSÍNTESE

A fotossíntese é o processo através do qual as plantas convertem energia luminosa em energia química, transformando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), água (H<sub>2</sub>O) e minerais em compostos orgânicos (açúcares) e liberando oxigênio gasoso (O<sub>2</sub>). Na fotossíntese, a radiação eletromagnética (luz) é utilizada para disponibilizar os elétrons (através da oxidação da água) necessários à redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, gerando paralelamente energia para síntese de ATP. Esse poder assimilatório é, então, usado para reduzir CO<sub>2</sub> a carboidratos, com ganho líquido de energia química. O processo como um todo pode ser resumido pela equação abaixo:



Para que a energia luminosa seja utilizada pelos sistemas vivos, é necessário que ela seja absorvida. Os pigmentos são responsáveis pela absorção da energia radiante. Cada pigmento absorve uma faixa de comprimento de onda e transmite e/ou reflete os comprimentos de onda não absorvidos. A clorofila é o pigmento responsável pela coloração das folhas, absorvendo luz principalmente nas faixas do azul/violeta e no amarelo/vermelho. Como a maior parte da radiação na faixa do verde é refletida pelas clorofilas, as folhas apresentam essa tonalidade.

Os principais pigmentos fotossintetizantes são as clorofilas e os carotenóides. Apenas as clorofilas *a* especiais (P<sub>680</sub> e P<sub>700</sub>), localizadas nos centros de reação dos fotossistemas, participam diretamente das reações de transferência de elétrons. A clorofila *b* e os carotenóides são pigmentos acessórios, atuando indiretamente, ampliando a faixa de radiação absorvida e canalizando ou transferindo a energia luminosa às clorofilas *a* especiais. As moléculas das clorofilas são lipossolúveis e encontram-se associadas às membranas dos tilacóides, no interior dos cloroplastos. Os carotenóides (carotenos e xantofilas) são pigmentos

solúveis em lipídios. Eles apresentam coloração vermelha, laranja ou amarela. Assim como as clorofilas, os carotenóides encontram-se associados às membranas dos tilacóides. Em folhas verdes, a coloração dos carotenóides frequentemente é mascarada pela presença abundante de clorofilas, mas, durante a senescência foliar, os carotenóides tornam-se visíveis quando as clorofilas são destruídas.

A fase fotoquímica, luminosa ou clara é considerada a etapa inicial do processo fotossintético. A luz absorvida pelos pigmentos nas antenas é transferida para os centros de reação dos fotossistemas, possibilitando o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, o que resulta na produção de NADPH<sub>2</sub> e ATP. O ATP e, especialmente, o NADPH<sub>2</sub> são utilizados na etapa bioquímica, possibilitando a redução do CO<sub>2</sub> a açúcares. O processo fotoquímico resulta, portanto, na conversão da energia luminosa em energia química. O processo físico de transporte do CO<sub>2</sub> por difusão do ar externo até o local de reação, no estroma do cloroplasto, pode ser influenciado por diversos fatores, principalmente pela temperatura do ar, concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera e pelas condições de luminosidade e de umidade, que apresentam influência sobre a abertura dos estômatos. A fase bioquímica ou enzimática envolve a transformação do CO<sub>2</sub> em açúcares, processo que ocorre no Ciclo de Calvin, utilizando ATP e NADPH<sub>2</sub> provenientes da fase fotoquímica. O processo fotoquímico é afetado principalmente pela luz. Os processos bioquímicos, por sua vez, são afetados principalmente pela temperatura.

O estado hídrico das folhas (potencial hídrico) tem efeitos indiretos sobre a fotossíntese, influenciando o transporte do CO<sub>2</sub> via estômatos, que opõem menor ou maior resistência ao fluxo de gases e vapor de água entre o interior da folha e o meio externo. Os estômatos são, portanto, reguladores tanto da fotossíntese quanto da transpiração.

## Prática 3.1 - Pigmentos Hidrossolúveis e Lipossolúveis em Tecidos Vegetais

### Introdução

Os vegetais possuem o equipamento bioquímico necessário para transformar substâncias pouco energéticas ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) em moléculas ricas em energia ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). Na fotossíntese a energia luminosa absorvida pelos pigmentos é transformada em energia química. Os pigmentos absorvem determinados comprimentos de onda, refletindo outros, o que depende da estrutura química do pigmento.

Além das clorofilas e dos carotenóides, que são lipossolúveis, as plantas contêm outros pigmentos, como os flavonóides, que constituem uma série de compostos relacionados, solúveis em água, tendo como estrutura básica um esqueleto  $\text{C}_{15}$  de flavona. Os flavonóides são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células das plantas e representam o maior grupo de compostos fenólicos dos vegetais. Esses pigmentos se acumulam especialmente nas flores, conferindo-lhes as cores características, podendo variar do vermelho até o púrpuro e o azul. Desses pigmentos, os mais conhecidos são as antocianinas, cada qual com uma cor distinta, que varia conforme o pH, ainda que algumas sejam incolores. Embora também acumulem em grandes quantidades nas folhas de algumas espécies, os flavonóides (antocianinas e betalaínas) não participam diretamente da fotossíntese. Sua ação tem sido comumente associada à proteção do aparelho fotossintético contra os danos provocados pela radiação ultravioleta.

As antocianinas ocorrem na forma de glicosídeos, ligados comumente a uma ou duas unidades de glicose ou de galactose. A parte molecular sem açúcar ainda mantém a sua coloração característica e é denominada antocianidina. O acúmulo de antocianinas em caules, folhas ou frutos é estimulado por níveis elevados de luz, por deficiência de certos nutrientes como nitrogênio, fósforo e enxofre e por temperaturas

baixas. Além de sua importância como atrativo para insetos polinizadores, os flavonóides também afetam a interação das plantas com outros organismos, como, por exemplo, com as bactérias envolvidas na fixação biológica do nitrogênio e, também, com microorganismos fitopatogênicos. Além disso, os flavonóides têm sido utilizados como marcadores na quimiotaxonomia.

### Objetivos

Observar a separação de pigmentos lipossolúveis e hidrossolúveis, por meio de sua partição em solventes não miscíveis. Acompanhar as variações nas propriedades de alguns desses pigmentos, em função das variações do pH do meio ou de sua hidrólise parcial.

### Materiais

- Folhas coloridas de *Iresine herbstii* (Amarantaceae, coração-de-maria) que acumulam betalaína, e de *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae, cróton) que acumulam antocianinas
- Homogenizador ou liquidificador
- Tubos de ensaio (2,5 x 12,5 cm), funil de vidro e pipetas
- Funil de separação
- Acetona 50% (v/v) e éter etílico
- Gaze e papel filtro
- NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N
- KOH 3 N

### Procedimentos

Caso sejam utilizadas folhas de cróton, pode ser necessário adicionar 2-3 gotas de HCl concentrado (6N) para manter a coloração vermelha durante a extração dos pigmentos. As antocianinas

provenientes de folhas de cróton permitem melhores resultados em relação à variação de coloração em resposta ao pH do que as antocianinas provenientes da *Iresine*. Todavia, os pigmentos verdes da *Iresine* são mais vistosos do que os do cróton, que ficam, na maioria das vezes, com uma tonalidade amarelada.

Homogenize 15 g de folhas coloridas da espécie sugerida em 100 mL de acetona 50% (v/v). Filtre o homogenato através de gaze e depois através de duas camadas de papel-filtro. Coloque 10 mL do filtrado num funil separador e adicione, escorrendo pelas paredes, igual quantidade de água. Execute movimentos leves de rotação no funil separador e observe os resultados. Em seguida, adicione lentamente 10 mL de éter etílico. Execute movimentos leves de rotação no funil separador e observe os resultados. Recolha em tubos de ensaio a maior parte da camada inferior, descartando a interface. Recolha, em outro tubo de ensaio, toda a camada superior obtida durante a separação.

Adicione em um tubo de ensaio cerca de 5 mL da fração correspondente à camada inferior e dilua com igual volume de água destilada. Observe o resultado. Proceda da mesma forma com 2 tubos contendo material proveniente da camada superior, observando as diferenças.

Adicione a tubos de ensaio cerca de 5 mL da fração correspondente à camada inferior e acrescente a cada um deles uma quantidade diferente de gotas de NaOH 0,1 N. Observe os resultados. Em seguida, adicione aos respectivos tubos a mesma quantidade de HCl 0,1 N, observando o que acontece.

A um dos dois tubos de ensaio contendo a mistura proveniente da camada superior, acrescente algumas gotas de KOH 3 N. Agite ambos e observe o que acontece em cada um deles.

Explique todos os resultados obtidos.

## Questionário

1. Considerando as propriedades gerais de solubilidade dos pigmentos dos cloroplastos das fanerógamas, seria provável a sua presença nos vacúolos de folhas fotossintetizantes? Em algum outro grupo vegetal isso é conhecido?
2. Quais são os pigmentos lipossolúveis das plantas verdes? Onde eles se localizam nas células?
3. Quais são os pigmentos hidrossolúveis das plantas verdes e em que parte das células eles se encontram?
4. O que é possível concluir com a quebra da ligação entre o tetrapirrol e a cauda fitol das moléculas de clorofilas pelo KOH 3N?
5. Por que podemos afirmar, com certeza, que as antocianinas não participam da fotossíntese?
6. Quais são as funções dos flavonóides (antocianinas e betalaínas) nos tecidos vegetais?
7. Por que certos frutos ficam mais vermelhos quando exposto à luz solar?
8. Se você fizesse um extrato de pétalas de uma flor vermelha, que tipo de pigmento seria encontrado ao fazer sua separação por partição em solventes? O que aconteceria se você alterasse o pH das soluções?
9. Considerando os efeitos do pH sobre as antocianinas, você acredita que diferenças no pH dos tecidos possam contribuir para a variação nas cores das pétalas das flores? Explique.

## Prática 3.2 - Separação dos Pigmentos Cloroplastídicos por Cromatografia em Papel

### Introdução

Os cloroplastos são as organelas responsáveis pela fotossíntese. Eles apresentam estrutura formada por dupla membrana (envelope do cloroplasto), uma matriz fluida (estroma) e um sistema membranas internas denominadas tilacóides. Os tilacóides apresentam membranas lipoprotéicas cuja composição difere bastante das membranas do envelope. Os tilacóides apresentam uma maior proporção de ácidos graxos polinsaturados, o que confere às suas membranas alta fluidez, mas, em contraste, elevada sensibilidade aos danos causados por radicais livres.

A fluidez das membranas dos tilacóides favorece a captura da energia radiante, uma vez que os pigmentos da fotossíntese encontram-se associados a ela em estruturas denominadas fotossistemas. Os fotossistemas são constituídos por proteínas, por pigmentos acessórios (clorofila *a*, clorofila *b*,  $\beta$ -caroteno e xantofila), que compõem as “antenas”, e por centros de reação, formados por moléculas de clorofila *a* especiais, únicos pigmentos efetivamente envolvidas nos processos de transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese. Os pigmentos localizados nas “antenas” afunilam a energia radiante até os centros de reação dos fotossistemas I e II. A transferência da energia de excitação de uma molécula de pigmento para outra ocorre por ressonância (mecanismo Förster), sendo um processo puramente físico. Os pigmentos são responsáveis pela absorção da energia radiante e pela transferência dessa energia a uma série de compostos oxirredutíveis, que permitem a formação de  $O_2$ , ATP e  $NADPH_2$ .

Cada tipo de pigmento tem uma estrutura química definida, com um padrão específico de duplas ligações conjugadas, o que determina a absorção seletiva de certos comprimentos de onda e a sua coloração

característica. Em decorrência disso, a clorofila *a* é verde-azulada, a clorofila *b* é verde-amarelada, as xantofilas são amarelas e o  $\beta$ -caroteno é alaranjado. Além de apresentarem colorações típicas, esses pigmentos apresentam diferentes afinidades pelos diversos solventes orgânicos e pela água, o que se deve à proporção de radicais hidrofóbicos ou hidrofílicos que cada um deles possui.

Uma técnica extremamente simples que permite a separação desses pigmentos é a cromatografia em papel. Na década de 40, essa técnica revolucionou a separação e detecção de produtos de reações, permitindo a identificação de compostos químicos em plantas. No caso, a cromatografia consiste no uso de tiras de papel-filtro como suporte de uma fase aquosa (polar), na qual uma fase móvel orgânica (apolar) se dirige para o ápice. As substâncias a serem separadas são colocadas próximo à base da tira (origem) e se movem verticalmente, dependendo da sua afinidade por uma das fases (aquosa ou orgânica). A separação é, portanto, baseada na partição líquido-líquido dos compostos. Quanto mais apolar é pigmento, maior será sua afinidade pela fase móvel. Em contraste, quanto menos apolar ele for, mais retido pela fase estacionária (aquosa) ele será, permanecendo mais próximo à origem do cromatograma.

### Objetivos

Separar e identificar alguns pigmentos dos cloroplastos por meio da técnica de cromatografia em papel. Associar a composição química dos pigmentos a sua afinidade por solventes não miscíveis.

### Materiais

- Folhas de plantas (gramíneas, fumo, beijo, etc.)
- Tiras de papel-filtro cromatográfico (20 x 4 cm) ou outro papel-filtro de qualidade
- Cuba ou frasco de vidro para cromatografia

- Tetracloreto de carbono (solvente apolar)
- Balão de vidro
- Funil de vidro
- Placa de Petri
- Areia lavada
- Almofariz e pistilo
- Tesoura
- Gaze e papel filtro
- Acetona pura ou 80% (v/v)
- Pipeta de Pasteur (capilar)
- Secador de cabelo
- $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{MgCO}_3$

### Procedimentos

Obtenha folhas da planta escolhida e picote-as com uma tesoura (0,10 g de MF/25 mL de acetona 80%). Junte os pedaços de folhas com um pouco de areia fina e uma pitada de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou carbonato de magnésio ( $\text{MgCO}_3$ ) em um almofariz. Coloque um pouco de acetona e homogenize. Filtre o homogenato em gaze e, novamente, em papel-filtro. Recolha o filtrado em um balão de vidro.

Corte uma tira de papel-filtro cromatográfico (Whatman n.1) de aproximadamente 20 x 4 cm, tomando o cuidado para manuseá-la o mínimo possível, uma vez que a oleosidade da mão interfere sobre a resolução do cromatograma. Com uma pipeta Pasteur, passe pelo menos 20 camadas do extrato dos pigmentos foliares sobre a origem do cromatograma, que deverão ser estreitas e concentradas, devendo-se ventilar levemente o papel com secador de cabelo após a aplicação de cada camada.

Em seguida, coloque 5 a 10 mL de tetracloreto de carbono (solvente apolar; fase móvel) em uma cuba. Fixe a tira de papel-filtro (contém a água; fase estacionária) numa placa de Petri invertida e

introduza-a no interior da cuba, de modo que a extremidade encoste no solvente, mas sem mergulhar a origem.

Após 60-90 minutos, identifique os pigmentos, considerando a coloração que cada faixa formada apresentou.

### Questionário

1. Observe na literatura e descreva as principais características das estruturas moleculares dos pigmentos dos cloroplastos.
2. Como é explicada a separação de pigmentos pela cromatografia em papel, considerando-se a estrutura molecular de cada composto?
3. Por que as clorofilas *a* e *b* não se separam bem na cromatografia em papel?
4. Identifique as fases estacionária e móvel do sistema. Explique como elas estão atuando na separação dos pigmentos.
5. Na cromatografia, caracterize os termos: “origem”, “frente” e “valor  $R_f$ ”.
6. Quais são as principais características dos cloroplastos relacionadas à fase fotoquímica da fotossíntese?
7. Considerando os resultados da aula e conhecendo a estrutura molecular das clorofilas, quais são os efeitos gerais das deficiências de nitrogênio e de magnésio em plantas?
8. Por que os carotenóides somente são visualizados durante a senescência foliar?

## Prática 3.3 - Determinação do Espectro de Absorção dos Pigmentos dos Cloroplastos

### Introdução

A luz é uma forma de energia radiante resultante de uma pequena fração da radiação eletromagnética perceptível ao olho humano, sendo constituída por movimentos ondulatórios na forma de pacotes de energia (fótons). A luz visível é definida como qualquer radiação eletromagnética que se situa entre as faixas do ultravioleta e do infravermelho. Para que a energia luminosa seja utilizada pelos sistemas vivos é necessário que ela seja absorvida e, nas plantas, a absorção dessa energia é realizada pelas clorofilas e carotenóides.

As folhas absorvem mais fortemente as radiações nas faixas do azul-violeta e do amarelo-vermelho, mas transmitem ou refletem quase toda a radiação na faixa do verde. Cada fóton da radiação absorvida irá excitar uma molécula de clorofila ou carotenóide nos tilacóides dos cloroplastos. Parte da energia de cada fóton, independente da sua energia (cor, faixa do espectro ou comprimento de onda) é dissipada na forma de calor. Outra fração dessa energia é dissipada como fluorescência, radiação emitida pelas clorofilas na região do vermelho e em comprimento de onda maior do que o recebido. A fluorescência tem sido utilizada na avaliação da ocorrência de estresses em plantas, sendo uma estimativa da eficiência fotoquímica, parâmetro fisiológico que estima a eficiência com que os fótons absorvidos pelas antenas dos fotossistemas são convertidos em poder redutor (NADPH). Normalmente, a eficiência fotoquímica é reduzida quando as plantas são submetidas a condições de estresses.

Cada pigmento que participa da fotossíntese apresenta uma coloração que está diretamente relacionada a sua estrutura química e, como consequência, cada pigmento apresenta regiões específicas de absorção no espectro de radiação, que, geralmente, correspondem às

suas cores complementares. Os pigmentos carotenóides apresentam picos de absorção da radiação nas faixas correspondentes às suas cores complementares (azul-violeta), absorvendo bem faixas de radiação com maior energia. Todavia, as clorofilas, além de absorverem nas faixas correspondentes a sua cor complementar (vermelho e vermelho-longo), também absorvem na região do azul-violeta.

A determinação das faixas de absorção características de cada pigmento pode ser obtida com a utilização de espectrofotômetros, equipamentos que utilizam o princípio da decomposição da luz branca pela passagem dessa radiação através de um prisma. Cada faixa de radiação monocromática é obtida pela seleção de determinado comprimento de onda por um filtro (monocromador). Esses equipamentos permitem obter o “espectro de absorção”, que consiste na determinação da absorção relativa (absorvância) do pigmento em cada comprimento de onda ( $\lambda$ ). Quando se estuda os efeitos da luz de diferentes comprimentos de onda, usando quantidades não saturantes num processo fisiológico, como a fotossíntese, por exemplo, obtém-se um “espectro de ação”. O espectro de ação, comparado com o espectro de absorção do pigmento, ajuda a elucidar a possível participação do pigmento no processo.

A espectrofotometria permite determinar, de um modo quantitativo, a concentração de substâncias que, em solução, absorvem radiação luminosa. A Lei de Lambert-Beer é uma relação matemática que forma a base da análise espectrofotométrica e mostra que a absorvância de uma solução é diretamente proporcional à concentração somente até certo limite, apresentando ajustamento logarítmico. As equações  $A = -\log(I/I_0)$  e  $A = a \cdot b \cdot c$  correspondem a representações matemáticas da Lei de Lambert-Beer, onde: **A** = absorvância medida com a utilização de um espectrofotômetro, **I<sub>0</sub>** = intensidade da radiação incidente em determinado comprimento de onda, **I** = intensidade de radiação transmitida pela amostra, **b** = caminho óptico da luz através da amostra (distância que a luz percorreu por ela, geralmente, 1 cm), **a** = constante conhecida como coeficiente de absorvidade molar (varia de substância

para substância e com o solvente utilizado), e  $c$  = concentração molar da substância.

### Objetivos

Determinar o espectro de absorção dos pigmentos cloroplastídicos e de soluções coloridas. Verificar a ocorrência de fluorescência das clorofilas em extratos cetônicos.

### Materiais

- Extrato cetônico de pigmentos de cloroplastos
- Extrato cetônico de carotenóides purificados
- Extratos etéreos de *Iresine* e/ou de *Codiaeum*
- Extrato aquosos de antocianinas ou soluções de azul de metileno, vermelho neutro, dicromato de potássio e/ou de outro corante qualquer
- Acetona pura ou 80%
- Colorímetro ou espectrofotômetro
- Anilina verde (obtida em lojas de artigos para festas)
- Tubos de ensaio ou cuba de vidro bipartida
- Lâmpada refletora de 100-150 W
- Folhas de plantas de *Allamanda cathartica* L. (Apocinaceae) mantidas à sombra e na luz
- $\text{CaCO}_3$

### Procedimentos

Colete folhas de gramíneas ou de outra espécie sugerida (fumo, espinafre, etc.). Picote 50 mg de folhas e macere em 25 mL de acetona pura adicionada de uma pitada de  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de cálcio). Filtre o homogenato em papel de filtro, lavando o mesmo até a retirada de todo

o pigmento aderido. Mantenha o extrato protegido da luz. Utilizando o extrato cetônico de pigmentos foliares, determine a absorvância nos comprimentos de onda disponíveis no colorímetro (filtros) ou no espectrofotômetro de 5 em 5 nanômetros ( $10^{-9}$  m). Caso o extrato fique muito concentrado, dilua-o com acetona. Use acetona pura para ajustar o zero de absorvância (ou 100% de transmitância) no equipamento. Construa um gráfico e coloque na abscissa os comprimentos de onda e, na ordenada, as respectivas absorbâncias. Da mesma forma, determine o espectro de absorção de uma preparação de carotenóides purificados ou de uma solução aquosa de dicromato de potássio e compare com o espectro anterior. Determine os espectros de absorção dos demais pigmentos ou extratos disponíveis e compare os resultados.

Utilizando-se fórmulas específicas encontradas na literatura também é possível determinar, com o auxílio de um espectrofotômetro, as concentrações de pigmentos fotossintéticos provenientes de folhas de plantas.

Para observar o fenômeno de fluorescência, transfira para uma cuba de vidro bipartida ou para um tubo de ensaio o restante do extrato de pigmentos totais obtido. No outro lado da cuba ou em outro tubo de ensaio, coloque uma solução aquosa de anilina verde. Exponha o conjunto a uma fonte de luz forte e observe a variação de cor nas soluções.

### Questionário

1. O que é luz? Nas plantas, quais pigmentos são responsáveis pela sua absorção?
2. Quais são as faixas de comprimento de onda em que os extratos de pigmentos dos cloroplastos mais absorvem?
3. Por que a absorvância na região do verde é menor?

4. O que é fluorescência? Como ela pode ser utilizada como estimativa da eficiência fotossintética das plantas?

5. Como ocorre emissão de fluorescência da clorofila e por que esse fenômeno deve ser mais intenso no recipiente com o solvente contendo os pigmentos fotossintetizantes do que nas membranas do tilacóide?

6. Os carotenóides apresentam espectro de absorção semelhante aos das clorofilas?

7. Para quantificar as clorofilas *a* e *b* de um extrato cetônico por meio de um espectrofotômetro, podem-se utilizar comprimentos de onda na faixa do azul? E do vermelho?

8. Qual é o princípio básico do funcionamento de um espectrofotômetro?

9. Por que cada pigmento apresenta uma coloração específica? Em que faixas do espectro absorvem as clorofilas e os carotenóides?

10. O que representa o espectro de ação? Que correspondência existe entre o espectro de ação e espectro de absorção?

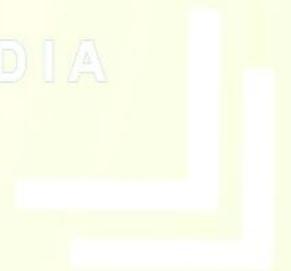
11. Diferencie plantas heliófilas e umbrófilas. Por que a proporção de pigmentos fotossintéticos varia entre esses dois grupos de plantas?



LOGIA

VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



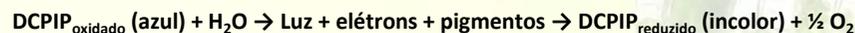
## Prática 3.4 - Formação de Poder Redutor em Cloroplastos Isolados (Reação de Hill)

### Introdução

A fotossíntese envolve uma série de reações de óxido-redução nas quais a água é oxidada e o CO<sub>2</sub> é reduzido. Essas reações se processam em presença de luz e com a participação dos pigmentos presentes nas membranas dos tilacóides, no interior dos cloroplastos. Moléculas de H<sub>2</sub>O são oxidadas pela ação da luz, liberando O<sub>2</sub>, em processo denominado fotólise ou foto-oxidação da água. A foto-oxidação da água é importante para a fotossíntese, uma vez que os fótons de energia radiante estimulam a ocorrência de reações redoxes em componentes e pigmentos que compõem a cadeia de transporte de elétrons (CTE). No processo, a água funciona como agente redutor da CTE, fornecendo elétrons. A luz estimula o funcionamento da CTE, sistema que tem como receptor final de elétrons moléculas de NADP<sup>+</sup> (forma oxidada) que, ao receberem elétrons, são reduzidas a NADPH<sub>2</sub>. Esse poder redutor (NADPH<sub>2</sub>) é fundamental para a redução do CO<sub>2</sub> a açúcares. Paralelamente à formação do NADPH<sub>2</sub>, também são produzidas moléculas de ATP em resposta ao gradiente de potencial eletroquímico formado entre o estroma e o lúmen dos tilacóides, ambos decorrentes do fluxo de elétrons na CTE.

A visualização dos fenômenos de fluxo de elétrons em sistemas biológicos não é possível sem que sejam utilizados determinados artifícios. Quando submetidos a condições adequadas, cloroplastos isolados são capazes de realizar essas reações. Isso foi descoberto por Robert Hill, em 1937, ao observar que cloroplastos isolados produziam oxigênio quando iluminados em presença de oxalato férrico. Mais tarde foram descobertos outros compostos, como as quinonas e certos corantes, que também podiam atuar como “oxidantes de Hill”. Essa reação ficou conhecida como “Reação de Hill”.

Um desses compostos é o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), capaz de detectar baixos níveis da atividade de Hill e mudar da cor azul (quinona), quando oxidado, para o incolor (fenol) ao ser reduzido, conforme reação a seguir:



### Objetivos

Demonstrar, indiretamente, o funcionamento da CTE e a formação de poder redutor (NADPH<sub>2</sub>) em cloroplastos isolados e iluminados, utilizando um corante de oxido-redução (DCPIP).

### Materiais

- Solução de DCPIP a  $2,5 \times 10^{-4}$  M (PM: 290,8 g/L; Preparo  $\Rightarrow$  DCPIP<sub>oxidado</sub>: 0,0073 g/100 mL)
- Cristais de ácido ascórbico
- Tampão fosfato de potássio 0,4 M, pH 6,8 (Preparo  $\Rightarrow$  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 34,034 g/L + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 27,844 g/L)
- Centrífuga refrigerada
- Tubos de centrífuga
- Béqueres de 200 mL
- Tubos de ensaio pequenos
- Pipetas de 1 e 2 mL
- Folhas de beijo, fumo, espinafre, etc.
- Sacarose 0,4 M (preparo: 136,92 g/L)
- Funil de vidro
- Homogenizador ou liquidificador
- Banho de gelo
- Lâmpada refletora de 100-150 W
- Gaze
- Pinça

- Papel-alumínio

## Procedimentos

Utilizando um liquidificador, homogenize 20 g de folhas de beijo (*Impatiens balsamina* L., Balsaminaceae) em 100 mL de uma solução gelada de sacarose 0,4 M, preparada em tampão fosfato, pH 6,8, durante dois minutos. Filtre o homogenato através de quatro camadas de gaze, recolhendo o filtrado em tubos de centrífuga mantidos em banho de gelo. Centrifugue o filtrado a 200 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Colete o sobrenadante e centrifugue-o novamente por 10 minutos, a 1000 rpm. Despreze o sobrenadante e ressuspenda o precipitado na mesma solução utilizada anteriormente. Os cloroplastos estarão prontos para serem utilizados. Todo o material a ser utilizado (vidrarias e soluções) deve ser previamente resfriado em congelador e mantido em banho de gelo durante a extração e nas preparações da aula.

Separe 4 tubos de ensaio pequenos e enumere-os de 1 a 4. Coloque 0,5 mL da suspensão de cloroplastos nos tubos 1, 2 e 3. Adicione 3,0 mL de água no tubo 1 e 0,5 mL no tubo 4. Adicione 3,0 mL da solução de DCPIP<sub>oxidado</sub> (azul) aos tubos 2, 3 e 4. Envolve o tubo 3 em papel alumínio. Anote as cores iniciais de cada tubo de ensaio. Exponha o conjunto de tubos a uma fonte de luz por um período de 5-10 minutos e, após esse intervalo, anote os resultados considerando as cores finais observadas em cada um dos tubos.

Após esses procedimentos, acrescente um cristal de ácido ascórbico aos tubos 3 e 4, anotando os resultados e interpretando-os. Para explicar os resultados, considere que o potencial redox do DCPIP<sub>oxidado</sub> está em torno de 0,2 V (próximo ao valor do potencial redox do citocromo  $b_{6/f}$ ), e o do ácido ascórbico equivale a 0,0 V.

## Questionário

1. Explique no que consiste a “Reação de Hill”.

2. Em condições naturais, que componente da cadeia de transporte de elétrons (CTE) é o oxidante natural de Hill?

3. Explique como a luz, os cloroplastos e os pigmentos atuam na descoloração (redução) do DCPIP<sub>oxidado</sub>.

4. Explique porque a solução de DCPIP se descolore após a adição de ácido ascórbico.

5. Por que é necessário o uso de temperaturas baixas, sacarose e tampão fosfato durante o preparo da suspensão dos cloroplastos?

6. Nessa prática, a utilização de oxidantes artificiais de Hill permite detectar a ocorrência das “reações fotoquímicas”, mas, em contraste, impede que ocorram as reações de “fixação de CO<sub>2</sub>”. Explique por que isso acontece.

7. Alguns herbicidas têm como princípio ativo, substâncias que atuam na fase fotoquímica da fotossíntese. Apresente alguns exemplos e explique o que eles causam.

## Prática 3.5 - Determinação da Irradiância de Compensação

### Introdução

Dentre os fatores ambientais que influenciam a fotossíntese, a luz é um dos mais importantes. Uma propriedade característica da luz é o seu brilho, diretamente relacionado à intensidade com que os fótons chegam aos pigmentos nas antenas dos fotossistemas. A taxa fotossintética de folhas isoladas expostas ao ar atmosférico normal (0,037% de CO<sub>2</sub>) varia de acordo com a intensidade luminosa. A irradiância em que a taxa fotossintética líquida (real) é zero, ou seja, a troca de CO<sub>2</sub> entre a folha e o meio ambiente é nula, é denominada “irradiância de compensação” ou “ponto de compensação luminoso”. Nesse ponto de irradiância a planta se mantém em equilíbrio. Não morre, mas, também, não cresce. A equação a seguir apresenta os componentes básicos relacionados à fotossíntese líquida das plantas:

$$FS_{\text{líquida}} = FS_{\text{total}} - (\text{Respiração} + \text{Fotorrespiração})$$

A irradiância de compensação varia de espécie para espécie, com as condições de luminosidade, com a idade, com a temperatura, com a concentração de CO<sub>2</sub> e, até mesmo, com a posição da folha na planta. Abaixo da irradiância de compensação ocorre perda líquida de CO<sub>2</sub>, podendo levar a planta à morte. Portanto, somente acima desse ponto se observa fotossíntese líquida e aumento na biomassa das plantas. Nas “plantas de sol” (heliófilas), a irradiância de compensação encontra-se entre 10 a 20 μmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Nas “plantas de sombra” (umbrófilas), a irradiância de compensação varia na faixa de 1 a 5 μmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, o que pode ser atribuído a sua baixa taxa respiratória, permitindo um ganho líquido de carbono mesmo em ambientes limitados por luz. Os pontos de saturação luminosa e de fotoinibição também podem ser determinados e representam, respectivamente, o nível de

radiação em que outros fatores passam a limitar a fotossíntese e o ponto em que o excesso de radiação começa a causar danos aos pigmentos e/ou às estruturas que constituem os aparelhos fotossintéticos das plantas.

Um método simples para se determinar a irradiância de compensação em folhas isoladas utiliza uma solução de vermelho de cresol, um indicador de pH. Essa solução tem coloração púrpura em meio alcalino, podendo ser utilizada para indicar o teor de CO<sub>2</sub> no ambiente. Quando o teor de CO<sub>2</sub> aumenta, a solução torna-se mais ácida e sua cor passa do púrpuro para o amarelo. Tal situação indica que a FS<sub>líquida</sub> é negativa. Quando a FS<sub>líquida</sub> é positiva, condição em que as plantas podem crescer, a concentração de CO<sub>2</sub> diminui no ambiente e a solução se torna mais alcalina, passando a apresentar uma coloração púrpura mais intensa. A manutenção da coloração original da solução indica que a concentração de CO<sub>2</sub> do ar permaneceu constante e, conseqüentemente, que a taxa fotossintética total foi igual ao somatório da respiração e da fotorrespiração, ou seja, a fotossíntese líquida igual à zero. A equação a seguir resume o exposto:



### Objetivos

Determinar a irradiância de compensação em folhas isoladas de plantas de diferentes espécies.

### Materiais

- Solução indicadora de vermelho de cresol (Preparo: 84 mg L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>; 7,45 g L<sup>-1</sup> de KCl; e 10 mg L<sup>-1</sup> de vermelho de cresol; pH ajustado para 8,1)
- Folhas de plantas indicadas pelo instrutor coletadas em ambientes contrastantes de sol e de sombra (uma gramínea,

uma pteridófito (samambaia), uma arbórea (mangueira), uma ornamental (*Ruellia* sp. – Acanthaceae), etc.)

- Rolhas de cortiça ou borracha
- Tubos de ensaio (12,5 x 1,5 cm), preferencialmente com tampas rosqueáveis
- Suportes para tubos de ensaio
- Papel-alumínio
- Pipeta de 10 mL
- Lâmpada refletora de 100-150 W
- Luxímetro
- Fita métrica ou trena

### Procedimentos

Adicione 2 mL da solução indicadora de vermelho de cresol a tubos de ensaio. Deixe um tubo como testemunha e fixe um segmento da folha túrgida (ou a própria folha, dependendo de seu tamanho) a outros tubos, fechando-os bem com tampa de cortiça ou de borracha ou rosqueando-os. Coloque plantas coletadas em ambientes ensolarados e em ambientes sombreados nesses tubos, submetendo-os à iluminação em distâncias aproximadas de 10 cm, 100 cm e 300 cm de uma lâmpada forte (100-150 W). Se disponível, com o uso de um luxímetro ou outro equipamento, determine as irradiâncias nessas distâncias. Na frente da fonte luminosa, coloque uma cuba de vidro com água para atenuar os efeitos do calor. Adicionalmente, podem ser preparados tubos de ensaio contendo segmentos de folhas murchas e/ou cobertos com papel-alumínio. Esses tubos deverão ser deixados a 10 cm da fonte de luz.

Após 1-2 horas, observe a coloração da solução indicadora nos diversos tubos e determine a irradiância de compensação para as espécies em estudo, considerando as colorações da solução indicadora de pH.

Em seguida, pegue um tubo de ensaio que contenha apenas a solução indicadora e sobre-o com uma pipeta de 10 mL, observando a mudança de coloração. Explique o resultado. Em outro tubo de ensaio que contenha apenas a solução indicadora, pingue algumas gotas de água mineral gasosa. Em outro tubo contendo solução indicadora, pingue gotas de água mineral não-gasosa. Observe as diferenças de coloração e explique os resultados. Como alternativa, pingue gotas de HCl e de NaOH diluídos em diferentes tubos de ensaio contendo o indicador de pH, explicando os resultados.

### Questionário

1. O que representam as irradiâncias de compensação, saturação e fotoinibição?
2. Por que “plantas de sol” geralmente morrem se colocadas à sombra?
3. Por que as “plantas de sombra” geralmente morrem se colocadas sob radiação luminosa intensa?
4. Sob um dossel florestal, a intensidade média de luz incidente é de 50  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Considere duas espécies, cujas irradiâncias de compensação sejam:  
A - 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
B - 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
Qual das duas teria condições de se estabelecer sob a floresta? Justifique.
5. Por que pedaços de folhas mantidos sob baixa luminosidade ou no escuro tornam a solução de vermelho de cresol amarelada?
6. Determinou-se a irradiância de compensação de uma folha a 20°C. Posteriormente, a irradiância de compensação da mesma folha foi

determinada a 40°C. Será detectada alguma diferença nos valores obtidos? Justifique.

7. No presente exercício, você observou que a solução do tubo contendo a folha localizada a 10 cm fonte luminosa adquiriu coloração púrpura bastante intensa; a 100 e 300 cm, a solução ficou amarelada. O que você deverá fazer para determinar a irradiância de compensação aproximada de cada uma das folhas?

8. Quando uma floresta é cortada para se retirar as árvores dominantes ou quando se abre uma grande clareira em uma mata, novas espécies são observadas na ocupação dessa área, além do desaparecimento de plantas que compunham o sub-bosque. Por que isso acontece e que tipos de plantas ocorrem nessa nova condição? Justifique a sua resposta.

9. É possível a aclimação de plantas de sombra a ambientes ensolarados? E a aclimação de plantas de sol a ambientes sombreados? Apresente exemplos.

10. O que aconteceria com a solução indicadora de vermelho de cresol caso fossem colocadas no interior dos tubos de ensaio folhas provenientes de plantas submetidas a estresses hídricos?

11. Considerando a possibilidade de plantios consorciados (milho/feijão), explique porque sob o ponto de vista da fotossíntese isso é possível. Em contraste, seria possível o cultivo de plantas de milho em uma condição de sub-bosque? Justifique a sua resposta.

12. A região do sul da Bahia (Ilhéus e Itabuna) abriga um dos poucos remanescentes de mata Atlântica. Nessa região, existe o extrativismo a partir de plantas de cacauero cultivadas em sub-bosque na mata. Explique a correlação entre esses fatos.



LOGIA

VEGETAL

PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 3.6 - Síntese de Amido: Efeitos das Clorofilas e da Luz

### Introdução

Durante a fotossíntese, diversas substâncias orgânicas são produzidas a partir do  $\text{CO}_2$  presente na atmosfera. A fotossíntese tem como função a produção de substratos que serão utilizados como “combustíveis” na respiração. Desses substratos, os principais são a sacarose, um açúcar solúvel e não-redutor, produzido no citossol e armazenado no vacúolo, e o amido, um carboidrato não-redutor e insolúvel em água, produzido e armazenado nos cloroplastos. Hexoses livres como a glicose e a frutose (açúcares redutores) são menos abundantes. Os açúcares não-redutores são moléculas menos reativas que os redutores e, portanto, mais adequados para compor o metabolismo. A sacarose, principal açúcar transportado no floema, pode ser acumulada em grandes quantidades em certos tecidos de plantas como em cana-de-açúcar, sorgo e beterraba. Todavia, a reserva de carboidratos mais importante para a maioria das plantas é o amido.

O amido forma-se sempre em plastídios, onde ocorrem como grãos de estrutura característica. Nas folhas, o amido é sintetizado nos cloroplastos, mas em tecidos não clorofilados é formado nos amiloplastos (leucoplastos). O teor de amido nas folhas aumenta durante o dia em virtude da translocação através do floema não acompanhar a taxa de acúmulo promovido pela fotossíntese. À noite, como a translocação continua e a respiração o consome, os níveis de amido nas folhas decrescem. O amido apresenta-se constituído por moléculas de amilose (cadeias não-ramificadas) e de amilopectina (cadeias ramificadas). Ambas colorem-se pelo "lugol", uma combinação de iodo-iodeto de potássio, o que permite a utilização dessa solução para testar *in situ* a presença de amido nas células.

### Objetivos

Relacionar a presença de amido com a ocorrência de clorofilas em folhas variegadas. Demonstrar a importância da luz para o acúmulo de amido nas folhas.

### Materiais

- Folhas variegadas de *Coleus* sp. (tapete, Lamiaceae) ou de outras espécies com folhas variegadas e folhas totalmente verdes (feijão)
- Solução de lugol (Preparo: 15 g de KI + 3 g de  $\text{I}_2$  em 1 litro de água. *Atenção*, pois essa solução é tóxica; não respire os vapores durante a preparação)
- Azulejo branco ou vidro de relógio ou placa de Petri
- Álcool etílico comercial e fogareiro (lâmparina)
- Béqueres de 250 mL
- Papel alumínio

### Procedimentos

#### I. Efeitos da clorofila

Inicialmente, observe folhas de plantas variegadas (*Coleus* sp., preferencialmente). Faça um desenho desta folha, mostrando os limites entre as manchas brancas e verdes. Se a folha apresentar cutícula espessa, faça vários furos com um estilete em toda a sua extensão. Mergulhe a folha, pelo período de meio a um minuto, em água fervente e transfira-a para um copo contendo álcool etílico em banho-maria, até a sua completa despigmentação.

Coloque a folha despigmentada, com a face abaxial para cima, sobre um azulejo branco (ou vidro de relógio ou placa de Petri) e trate-a

com gotas de lugol. Uma coloração azulada intensa, quase preta, indica a presença de amido.

## 2. Efeito da luz

Obtenha uma folha de *Coleus*, de um ramo hidratado e que tenha permanecido por uns três dias no escuro. Alternativamente, também podem ser utilizadas folhas de plantas de milho ou de feijão mantidas no escuro pelo mesmo período. Trate-as com algumas gotas de lugol.

Pegue outra folha da mesma espécie, mas que tenha sido mantida sob luz intensa, e proceda da forma descrita no parágrafo anterior, no intuito de determinar a presença ou não de amido.

Em uma terceira folha, coloque um pequeno pedaço de papel alumínio suficiente para cobrir uma área reduzida do limbo foliar, deixando-o por uma semana. Trate-a também com algumas gotas de lugol. Compare os resultados.

## Questionário

1. Em que parte de uma folha variegada se verifica a presença de amido? Por que o principal carboidrato de reserva em plantas não é a sacarose?
2. Qual é o papel da luz e dos cloroplastos na síntese de amido?
3. Uma folha verde e branca apresentou reação positiva ao lugol nas partes claras. Como você explica isso?
4. Tecidos internos de um caule não apresentam cloroplastos desenvolvidos, no entanto o teste com lugol acusa a presença de amido nesses tecidos. Explique.
5. Quais são as organelas celulares que acumulam amido?

6. Como se explica o acúmulo de amido em regiões não fotossintetizantes como em tubérculos de batata, uma vez que o amido não é solúvel em água?

7. Por que tubérculos de batata ficam com suas cascas esverdeadas quando expostos à luz?

8. Apresente exemplos de partes ou de órgãos vegetais que não possuem clorofila, mas que acumulam amido.

9. Por que o amido de milho (Maizena®, por exemplo), tubérculos de batata e folhas de papel sulfite dão respostas positivas ao teste do lugol?

## Prática 3.7 - Fatores que Afetam a Fotossíntese em *Ceratophyllum* sp.

### Introdução

Informações relativas à influência da intensidade e da qualidade da radiação luminosa, do consumo de  $\text{CO}_2$  e da temperatura sobre a fotossíntese podem ser obtidas através de experimentos utilizando plantas de *Ceratophyllum* sp. (pinheirinho d'água, rabo-de-raposa) submetidas a diferentes condições ambientais. Cada pigmento absorve em faixas determinadas do espectro de radiação, refletindo ou transmitindo a radiação em outras regiões. O  $\text{CO}_2$  é um substrato fundamental da fotossíntese e a sua concentração no ambiente influencia diretamente o processo. A temperatura também tem efeitos diretos sobre as reações enzimáticas da fotossíntese, reduzindo ou aumentando a energia de ativação, podendo provocar a desnaturação de enzimas e a paralisação das reações químicas.

Diversas experiências podem ser conduzidas utilizando ápices de um ramo novo dessas plantas subaquáticas mantidas em solução aquosa de  $\text{KHCO}_3$  a 0,1% (p/v), contando-se o número de bolhas liberadas. As plantas, com o ápice voltado para baixo, são introduzidas em tubos de ensaio colocados dentro de uma cuba contendo água para controlar a temperatura. Deve-se escolher, de preferência, a ponta de um ramo novo e bem verde. Após o corte, as bolhas a serem contadas saíram do caule pela parte seccionada. Deve-se entender que, nesses experimentos, os resultados nem sempre são perfeitos, pois o número de bolhas pode variar em função de muitos fatores como o tamanho do ramo, alterações mecânicas na região cortada e variações na solubilidade do oxigênio provocadas por mudanças de temperatura. Independente disso, o método é de extrema utilidade para aulas práticas em função de sua simplicidade e das inferências que o mesmo possibilita.

### Objetivos

Verificar os efeitos da luz e da temperatura sobre a fotossíntese. Comprovar a utilização do gás carbônico na fotossíntese e a sua liberação na respiração.

### Materiais

- Tubos de ensaio (12,5 x 1,5 cm)
- Tubo de ensaio grande (25,0 x 3,0 cm)
- Solução de  $\text{KHCO}_3$  0,1% (p/v) (preparar 750 mL: 0,75 g / 750 mL)
- Cuba de vidro
- Suporte para os tubos de ensaio
- Lâmpada refletora de 100-200W
- Lâminas de acrílicos azuis, verdes e vermelhas, ou folhas de papel celofane nessas cores ou outros tipos de filtros de radiação
- Termômetro e cronômetro
- Lâmina de barbear e pinça de ponta fina
- Ramos de *Ceratophyllum* sp. ou de *Elodea canadensis* ou de *Myriophyllum brasiliensis* ou de outra espécie subaquática recém-colhidos
- Solução de fenolftaleína a 0,1% (p/v) em etanol 96°GL

### Procedimentos

#### 1. Efeitos da intensidade de radiação sobre a fotossíntese:

Coloque um ramo apical de *Ceratophyllum* em um tubo de ensaio grande contendo solução de  $\text{KHCO}_3$  0,1%. Esse tubo de ensaio deve ser colocado no interior de um tubo maior (ou cuba) com água em temperatura de aproximadamente 30°C, para que o aquecimento não interfira nos resultados do teste. Coloque o conjunto a uma distância de

aproximadamente 15 cm da fonte luminosa. Caso as bolhas não estejam saindo após o corte, efetuar pequenas batidas na borda do tubo de ensaio no qual a planta está inserida. Esse procedimento facilita o início da liberação das bolhas. Esperar pelo menos 3 minutos para estabilização. O número de bolhas deverá ser contado durante 5 minutos a partir da primeira bolha que sair do ramo. Após essa contagem inicial, distanciar o conjunto para aproximadamente 50 cm da fonte luminosa. Esperar pelo menos 3 minutos para estabilização. O número de bolhas deverá ser contado novamente durante 5 minutos, a partir da primeira bolha que sair do ramo. Por último, colocar o conjunto a 1 m da fonte de luz, repetindo os mesmos procedimentos.

Normalize os dados considerando como 100 o número máximo de bolhas liberadas e determine os valores percentuais das outras distâncias. Faça um gráfico dos resultados do experimento, colocando na ordenada a intensidade da fotossíntese expressa pelo número médio de bolhas por minuto e, na abscissa, a intensidade de radiação ou a distância, em cm, da fonte de luz. Explique os resultados considerando o número de bolhas liberadas pelas plantas de *Ceratophyllum* nas diferentes condições testadas.

## 2. Efeitos da temperatura:

Mantenha o mesmo conjunto anterior a 15 cm da fonte luminosa. Neste procedimento, a distância da fonte de luz não será modificada. No recipiente externo ao tubo de ensaio contendo a planta subaquática (cuba), coloque água a temperaturas de 10, 20, 30, 50 e 70°C. Em cada uma dessas temperaturas, antes que se faça a contagem das bolhas, aguarde por pelo menos 3 minutos para estabilização. Para cada temperatura, faça a contagem do número de bolhas durante 5 minutos. Explique os resultados considerando o número de bolhas liberadas pelas plantas de *Ceratophyllum* nas diferentes condições testadas.

## 3. Efeitos da qualidade da radiação:

Mantenha outro conjunto similar ao anterior a 15 cm da fonte luminosa. Neste procedimento, a distância da fonte de luz também não será modificada. No recipiente externo ao tubo de ensaio contendo a planta subaquática (cuba), coloque água para evitar a influência da temperatura. À frente da fonte de luz, coloque cada um dos filtros de radiação, começando pelo azul, verde, vermelho, vermelho-longo (1 filtro vermelho + 1 filtro azul) e luz branca. Em cada um desses filtros e na luz branca, antes que se faça a contagem das bolhas, aguarde por pelo menos 3 minutos para estabilização. Para cada situação, faça a contagem do número de bolhas durante 5 minutos. Explique os resultados considerando o número de bolhas liberadas pelas plantas de *Ceratophyllum* nas diferentes condições testadas.

## 4. Efeitos da utilização do CO<sub>2</sub>:

Enumere 3 tubos de ensaio (12,5 x 1,5 cm) e adicione solução de KHCO<sub>3</sub> 0,1% até aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de seu volume. No tubo 1, coloque somente KHCO<sub>3</sub> (controle). No tubo 2, coloque a solução de KHCO<sub>3</sub> e um ramo de *Ceratophyllum*. Mantenha esse tubo próximo a uma fonte de luz (20 cm). No tubo 3, coloque solução de KHCO<sub>3</sub> e outro ramo de *Ceratophyllum*. Envolve este tubo de ensaio com papel alumínio ou deixe-o no escuro. Mantenha os tubos a 15 cm de uma fonte de luz. Após 1-2 horas, retire as plantas dos tubos. Em seguida, adicione uma ou duas gotas de fenolftaleína em cada um e observe as diferenças na intensidade de coloração em relação ao tubo controle. A fenolftaleína, um indicador de pH com a fórmula C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, apresenta-se como um sólido em pó branco, insolúvel em água e solúvel em etanol. A fenolftaleína apresenta-se incolor em pH abaixo de 8,2, rósea em pHs entre 8 e 10 e carmim ou fúcsia em pHs entre 10 e 12.

## Questionário

1. Explique detalhadamente por que o aumento da intensidade luminosa (aproximação da fonte luminosa) faz também aumentar o número de bolhas liberadas (fotossíntese) no ramo de *Ceratophyllum*.
2. Por que para se medir a taxa de fotossíntese em resposta a variações na intensidade de luz se deve sempre colocar o tubo contendo *Ceratophyllum* em um recipiente contendo água (cuba)?
3. Por que a fotossíntese da planta de *Ceratophyllum* também aumenta, até certo ponto, ao se aumentar a temperatura? Por que ocorre queda na fotossíntese em temperaturas mais elevadas? Porque a fotossíntese em temperaturas baixas é reduzida?
4. O aumento da temperatura pode ter causado o fechamento de estômatos nas plantas de *Ceratophyllum* reduzindo indiretamente a liberação de bolhas?
5. Por que águas contendo plantas subaquáticas são, em geral, mais ácidas à noite?
6. Nesses experimentos com *Ceratophyllum*, você está determinando a taxa de fotossíntese real (total) ou aparente (líquida)? Explique.
7. Que gás forma as bolhas que se desprendem do ramo de *Ceratophyllum* iluminado? Que evidências indiretas você obteve para suportar a sua afirmativa?
8. Por que foi adicionada no tubo de ensaio contendo a planta de *Ceratophyllum* uma solução de bicarbonato de potássio ( $\text{KHCO}_3$ ) e não  $\text{H}_2\text{O}$ ? O  $\text{KHCO}_3$  é um ácido ou uma base?
9. Na década de 70, *Theodor Wilhelm Engelmann* produziu um experimento interessante. Ele iluminou um filamento de alga com um micro-espectro de luz (na região do visível) que projetava radiação luminosa na superfície da alga, desde o violeta até o vermelho. No experimento, ele observou o crescimento e a concentração de bactérias aerófilas em faixas específicas do espectro. Essas bactérias são atraídas por oxigênio e acumulam onde esse gás encontra-se em maior disponibilidade. *Engelmann* observou maior acúmulo de bactérias na faixa do azul e, principalmente, na faixa do vermelho. Poucas bactérias se concentraram em porções da alga filamentosa iluminadas com a radiação verde. Explique as diferenças nos resultados encontrados por *Engelmann*.

## 4 - A ÁGUA EM CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS

As células das plantas superiores são circundadas por membranas que delimitam o protoplasto (plasmalema), o vacúolo (tonoplasto) e as organelas. Investigações a respeito da composição química, da ultra-estrutura e das funções das membranas indicam que todas possuem características comuns. A composição química mostra que a maioria delas apresenta cerca de 60% de proteínas e 40% de lipídios. Quanto à ultra-estrutura, não se conhecem ainda, ao certo, sua arquitetura e os tipos de força que causam a coesão dos constituintes protéicos e lipídicos. Com relação às suas funções, sabe-se que apresentam permeabilidade seletiva em relação às partículas (moléculas ou íons). Essa seletividade está, provavelmente, associada à natureza das partículas, à ultra-estrutura da própria membrana e à disponibilidade de energia metabólica.

Segundo a hipótese da "peneira molecular", existem poros nas membranas, através dos quais a taxa de penetração de moléculas hidrofílicas é inversamente proporcional ao seu tamanho. A entrada de partículas hidrofóbicas, de acordo com o "modelo lipídico" da membrana, estaria associada a sua solubilidade nos lipídeos. Esses modelos funcionam até certo ponto, mas algumas substâncias ionizadas e muitas moléculas atravessam as membranas celulares contra o gradiente de potencial eletroquímico, ou seja, por transporte ativo, se ajustando ao modelo do "mosaico fluido" da ultra-estrutura das membranas.

As moléculas podem atravessar as membranas por diferentes mecanismos. Na difusão livre, as partículas seguem o gradiente de potencial eletroquímico e se movem livremente do interior para o exterior celular ou vice-versa, alcançando o equilíbrio. Esse processo é afetado pela solubilidade das partículas em lipídeos (quanto mais lipofílicas, maior a sua penetração na membrana) ou pelo grau de ionização da partícula (quanto menos ionizada, mais fácil a sua penetração). Na difusão facilitada, admite-se que a substância se

combina com uma molécula transportadora no interior da membrana celular, atravessa-a e é liberada no meio interno, voltando o transportador a recarregar-se no meio externo. Nesse caso, a taxa de transporte da substância, ao longo do gradiente de potencial eletroquímico, é mais rápida do que a prevista pelo tamanho molecular e pela sua solubilidade em lipídios. Acredita-se que essas substâncias sejam transportadas por proteínas. O transporte ativo envolve principalmente a movimentação de íons minerais e metabólitos insolúveis em lipídeos, tais como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, que entram e saem da célula ou de seus compartimentos por meio de processos envolvendo uma combinação reversível com ATPases (proteínas) das membranas. O movimento ocorre contra o gradiente de potencial eletroquímico, com gasto de energia metabólica (ATP), levando ao acúmulo da substância no meio interno. Todavia, o acúmulo de uma substância não significa necessariamente que houve transporte ativo.

Os níveis de saturação hídrica em tecidos vegetais podem ser determinados pela quantificação do potencial hídrico ou pela avaliação do teor relativo de água. O potencial hídrico é determinado levando-se em conta o potencial químico da água, uma expressão quantitativa da energia livre associada a sua molécula. Em termodinâmica, a energia livre é uma medida da capacidade para realizar trabalho. Portanto, o potencial químico é uma grandeza relativa que expressa a diferença entre o potencial químico de uma substância em um determinado estado e o potencial químico dessa mesma substância em estado padrão. Por convenção, estabeleceu-se que o potencial químico da água pura (estado padrão onde somente existem moléculas de  $H_2O$ ) é 0 (zero). Essa situação não existe em sistemas biológicos, representando uma condição teórica de máxima energia livre e, portanto, máxima capacidade para realizar trabalho. Em função disso, nos sistemas biológicos, a energia livre da água sempre é reduzida e os valores dos seus potenciais são negativos. Assim, o potencial hídrico de um tecido vegetal representa o valor do potencial químico da água nesse tecido comparado com o potencial químico da água pura ( $\Psi_w^* = 0$ ). O potencial hídrico é simbolizado pela

letra grega *psi* ( $\Psi_w$ ), representando uma medida da energia livre da água por unidade de volume ( $J m^{-3}$ ). Essas medidas são estimadas em unidades de pressão, utilizando-se, atualmente, Pascal (Pa) ou, mais especificamente, Mega Pascal (MPa) como unidade.

Na maioria dos processos fisiológicos, o grau de saturação hídrica das células é muito importante. Porém, essas células nem sempre se encontram inteiramente saturadas, o que acarreta a formação de forças motoras para o fluxo de água através de tecidos ou de órgãos da planta. Diversas relações têm sido feitas entre o estado hídrico de células ou tecidos e a energia livre da água. Esta energia é afetada por fatores físico-químicos ou meramente mecânicos, como a rigidez da parede celular, por exemplo. A concentração de solutos no vacúolo determina o potencial de solutos ( $\Psi_s$ ), enquanto que a pressão hidrostática, condicionada pela parede celular, determina o potencial de pressão ou de parede ( $\Psi_p$ ). O potencial mátrico ou matricial ( $\Psi_m$ ) é afetado pela quantidade de colóides ou de estruturas micelares da parede celular. Todos esses potenciais compõem o potencial hídrico total ( $\Psi_w$ ) da célula ou do tecido, interferindo na sua capacidade de ganhar ou perder água. A equação (1) a seguir apresenta os principais componentes do potencial hídrico total ( $\Psi_w$ ):

$$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_m \text{ (1)}$$

Uma terminologia equivalente a dos potenciais também é usada no estudo de relações hídricas. Nela, os componentes do potencial hídrico são expressos em termos de pressão. Nessa terminologia, o potencial hídrico é representado pela equação (2), onde: potencial osmótico  $\Psi_s = -\pi$  (pressão osmótica), potencial mátrico  $\Psi_m = -\tau$  (pressão mátrica) e potencial de parede  $\Psi_p = P$  (pressão de parede).

$$\Psi_w = P - \pi - \tau \text{ (2)}$$

Os métodos conhecidos para determinação de cada um desses parâmetros não são precisos, uma vez que, em sua maioria, utilizam medições indiretas. Dentre os métodos existentes, alguns se baseiam na compensação na fase líquida, com destaque para o densimétrico (Schardakow), o refratométrico, o volumétrico e o de variação de peso ou de comprimento de células ou segmentos vegetais. Todos eles implicam na transferência de água entre as amostras e soluções-teste com concentração conhecida.

O potencial de solutos ( $\Psi_s$ ) pode ser determinado na própria célula, mediante o emprego de microscopia óptica (método da plasmólise-limite ou incipiente) ou pela medição direta da concentração osmótica do suco celular (métodos psicométrico, refratométrico ou criométrico). Para soluções diluídas de substâncias indissociáveis, como a sacarose, por exemplo, o potencial osmótico pode ser estimado pela equação de *van't Hoff*: ( $\Psi_s = -RTC_s$ , onde: **R** = constante dos gases ( $8,32 J mol^{-1} K^{-1}$ ); **T** = temperatura absoluta em Kelvin ( $273 +$  temperatura em  $^{\circ}C$ ); **C** = concentração de solutos na solução expressa em osmolalidade (moles de soluto  $L^{-1}$  de água). O sinal negativo na equação indica que os solutos dissolvidos reduzem o potencial hídrico da solução em relação ao  $\Psi_w^*$  (água pura).

O potencial de pressão ou de parede ( $\Psi_p$ ) pode ser calculado quando conhecidos o  $\Psi_w$  e o  $\Psi_s$ . Como a água nos sistemas biológicos tem comumente sua energia livre diminuída e, portanto, o potencial hídrico tem valor negativo, o potencial de pressão tem valor geralmente positivo, somente apresentando valor negativo em células sob tensão.

A determinação do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) implica na quantificação da “água presa”, “água livre” ou “água móvel”. Em sistemas biológicos, os métodos para essas determinações são muito refinados e, por isso, pouco utilizados nos estudos de relações hídricas. Em sistemas físicos, todavia, a determinação do  $\Psi_m$  é simples e pode dar uma idéia da importância desse componente ao nível celular.

## Prática 4.1 - Intensidade de Osmose

### Introdução

A passagem de um solvente do meio mais diluído (de maior energia livre ou de maior  $\Psi_w$ ) para o meio mais concentrado, através de uma membrana semipermeável, é denominada osmose. Duas soluções que apresentam quantidades iguais de partículas dissolvidas por unidade de volume e, portanto, o mesmo potencial hídrico, são isotônicas. Assim, não haverá transferência de água através de uma membrana que separa essas duas soluções, a menos que se exerça pressão em um dos lados. Ao se comparar duas soluções com diferentes concentrações, aquela que apresenta menor quantidade de solutos e, portanto, um potencial hídrico mais alto, é hipotônica. Em contraste, aquela que tem maior quantidade de solutos, cujo potencial hídrico é mais baixo (mais negativo), é hipertônica. Portanto, quanto mais concentrada uma solução, menor o seu potencial de solutos. Quando separada da água pura por membrana semipermeável, o resultado final é a movimentação da água para a solução, demonstrando a maior capacidade da água pura para realizar trabalho.

### Objetivos

Comparar os efeitos de soluções com diferentes pressões osmóticas na intensidade da osmose em um sistema físico. Correlacionar os resultados obtidos na aula com os processos de manutenção da turgescência celular, de absorção de água pelas raízes e de gutação.

### Materiais

- Açúcar cristal, açúcar refinado ou sacarose

- Sacos de diálise (membrana semipermeável, tripa artificial, tripa para linguça ou papel celofane)
- Pipetas de 1 mL
- Elásticos para dinheiro (gominha) ou *lastec*
- Suportes de metal ou garras para buretas
- Frascos grandes de maionese; béqueres de 1000 mL ou outro recipiente de vidro

### Procedimentos

Amarre uma das extremidades de três saquinhos de diálise (membrana semipermeável) e encha-os, respectivamente, com água de torneira (controle), água de torneira adicionada de 5 colheres de açúcar cristal e água de torneira adicionada de 10 colheres de açúcar cristal. Na outra extremidade de cada saquinho, encaixe uma pipeta de 1 mL. Amarre os saquinhos firmemente a cada pipeta, de forma que o nível da solução apareça na pipeta logo acima da parte amarrada.

Mergulhe os saquinhos em três recipientes com água de torneira, prendendo as pipetas a um suporte ou garra. Marque o nível inicial e, após 1-2 horas, observe a altura final das colunas de água absorvidas através das membranas, considerando a subida do líquido nas pipetas.

### Questionário

1. Defina a osmose sob o ponto de vista físico-químico.
2. Considerando os resultados obtidos, explique as diferenças encontradas nos três sistemas.
3. Por que quanto maior é a concentração de sacarose, maior e mais rápida é a subida da coluna líquida na pipeta?

4. Que outro fator, além da concentração de sacarose, poderia afetar a intensidade da osmose?

5. À medida que ocorre a entrada de água no osmômetro (saquinho), o que acontece com a sua pressão osmótica? Aumenta ou diminui? Justifique a sua resposta.

6. Que procedimento você adotaria para medir a pressão osmótica do sistema?

7. O que aconteceria com o sistema se você usasse como soluto ácido acético em vez de sacarose?

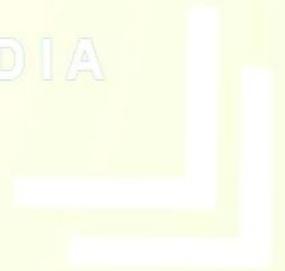
8. Até que altura máxima subiria a coluna líquida, supondo que a pipeta fosse infinitamente longa?

9. Que analogia você faria desse sistema com o processo de gutação em plantas.



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 4.2 - Permeabilidade de Biomembranas a Bases e Ácidos Fracos e Fortes

### Introdução

Treze elementos minerais são essenciais ao metabolismo das plantas. Esses elementos atuam como reguladores do grau de hidratação do meio, constituintes de moléculas e/ou, ainda, ativadores de enzimas em rotas metabólicas variadas. Essas funções básicas de um nutriente mineral ocorrem em ambientes encerrados por biomembranas. Quando a planta retira o nutriente das partículas do solo, mas esse elemento se encontra na parede celular, o mesmo ainda não foi efetivamente absorvido. A parede celular faz parte do apoplasto, volume do corpo da planta não envolvido por biomembranas, e neste ambiente celular não há como a planta utilizar o nutriente. Portanto, o nutriente mineral deve entrar no simplasto para exercer suas funções no metabolismo vegetal.

No entanto, para entrar em um ambiente encerrado por biomembranas, o nutriente deve passar por pelo menos uma delas, a membrana celular. A membrana plasmática é uma barreira à livre passagem de nutrientes minerais nas formas ionizadas (aniônica ou catiônica), conforme se encontram disponíveis:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{ZnOH}^+$ ,  $\text{Zn}^-$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^-$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{BO}_3$ ,  $\text{HBO}_3^{2-}$  ou  $\text{Cl}^-$ . A fase lipídica apolar da membrana celular oferece alta resistência à passagem desses íons. Também devido à fase polar da plasmalema, cátions e ânions não conseguem atravessá-la com facilidade, pois interagem com os pólos dessa biomembrana, ficando aí adsorvidos. Os pólos da membrana plasmática e de muitas membranas celulares são condicionados pela presença de átomos ou moléculas ligados aos lipídios da estrutura: fósforo (formando fosfolipídios), enxofre (sulfolipídios) ou, ainda, açúcares (glicolipídios). Em função disso, é necessária a participação de facilitadores de entrada dos nutrientes

minerais através das biomembranas, como por exemplo, de transportadores e canais iônicos.

### Objetivos

Demonstrar, pelo emprego de bases fracas e fortes, que a permeabilidade das biomembranas é, em geral, maior para as moléculas não carregadas (moléculas neutras). Correlacionar os resultados com a absorção dos elementos minerais.

### Materiais

- Plantas de abacaxi-roxo (*Tradescantia spathacea* Sw., Commelinaceae), zebrina (*Tradescantia zebrina* Heynh., Commelinaceae) ou outra espécie disponível
- Vidro de relógio, lâminas, lamínulas, pipetas de Pasteur
- Microscópio óptico
- Solução de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 0,025 M
- Solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 0,025 M
- Pinça, lâmina de barbear
- Piseta com água destilada, papel-filtro

### Procedimentos

Com uma lâmina de barbear, retire alguns segmentos da epiderme inferior de folhas de abacaxi-roxo ou de zebrina com cortes paradérmicos bem finos. Ao fazer os cortes, algumas células se rompem e perdem totalmente a pigmentação. Em função disso, deixe os cortes em vidro de relógio com água por cinco minutos. Evite fazer os cortes sobre a nervura principal da folha, pois nessa região as células são mais longas, dificultando a visualização dos resultados. Para obter cortes finos e fáceis de serem visualizados, posicione a lâmina praticamente paralela ao

tecido da epiderme inferior, arrastando a lâmina devagar para frente e com movimentos de serra.

Monte os cortes obtidos em lâmina e lamínula. Faça três montagens diferentes (três lâminas) com pelo menos três cortes, identificando-as com as soluções utilizadas. Adicione a uma das lâminas solução de NaOH (hidróxido de sódio) e a outra solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (hidróxido de amônio), ambas preparadas a 0,025 M. Faça o mesmo com outras duas lâminas contendo em uma delas solução de HCl e na outra solução de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ambas a 0,025 M. Monte a última lâmina apenas com água destilada (controle).

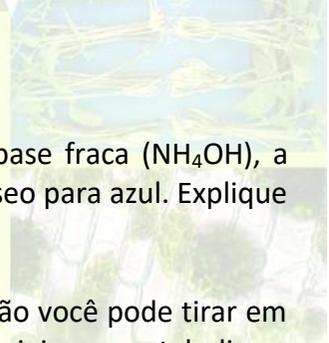
Depois de dez minutos, observe cada uma das lâminas em microscópio óptico e compare as cores dos tecidos da epiderme nos seguintes tratamentos: base forte (NaOH), base fraca ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), ácido forte (HCl), ácido fraco (solução de ácido acético -  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), e água destilada. Tenha como referência a cor da lâmina montada apenas com água destilada. Se não ocorrer a mudança de cor das células, espere mais cinco minutos adicionando mais solução em cada uma das lâminas na altura das bordas da lamínula. Não deixe faltar solução ou água destilada entre as lâminas e a lamínulas e utilize papel-filtro nas bordas das lamínulas para retirar o excesso de solução.

### Questionário

1. Explique o que é uma base forte e uma base fraca.
2. Explique os resultados obtidos na lâmina em que foi utilizada uma base forte e na lâmina do controle.
3. Explique os resultados obtidos na lâmina em que foi utilizada uma base fraca em relação à coloração das células.

4. Na lâmina que recebeu a solução contendo a base fraca ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), a coloração das células se alterou rapidamente de róseo para azul. Explique essa alteração na coloração.

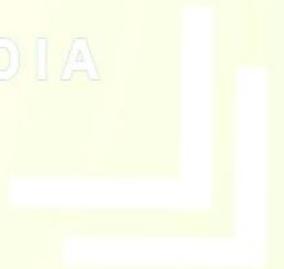
5. Considerando os resultados da aula, que conclusão você pode tirar em relação à absorção dos elementos minerais essenciais ao metabolismo das plantas?



LOGIA

VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 4.3 - Permeabilidade das Membranas Celulares às Moléculas e Íons

### Introdução

A “permeabilidade seletiva” é responsável pela capacidade discriminativa das membranas celulares. A permeabilidade depende das propriedades físico-químicas das membranas e dos íons e moléculas que interagem com elas. Todas as substâncias que conseguem atravessar as biomembranas têm propriedades físico-químicas que as tornam compatíveis com a seletividade, permitindo, assim, a sua passagem. Duas características que dificultam a passagem são o tamanho molecular e o grau de ionização das moléculas.

Alguns corantes conseguem atravessar as membranas e penetrar nas células. O vermelho-neutro é um corante vital que, em solução, predomina na forma molecular (não-ionizada), o que possibilita a sua entrada na célula e seu acúmulo no vacúolo. Esse corante muda de cor em resposta às variações no pH, apresentando em meio ácido coloração rosada ou avermelhada e, em meio alcalino, tonalidade amarelada, com ponto de viragem no pH 7,2.

A partir do momento em que o vermelho-neutro encontra-se armazenado no vacúolo, qualquer mudança de pH nesse ambiente poderá ser identificada pela alteração na coloração do corante. Como o conteúdo vacuolar do levedo (levedura ou fermento de pão) é de caráter ácido, o vermelho-neutro, ao penetrar na célula, mantém sua coloração característica. Se, contudo, uma base penetrar no interior das suas células, alterando o pH do meio intracelular (vacúolo), o vermelho-neutro muda de cor e torna-se amarelo. Esse corante pode, portanto, dar uma indicação da velocidade de penetração de uma substância na célula pelo tempo necessário para modificar a sua coloração.

### Objetivos

Avaliar a permeabilidade seletiva das membranas de células de levedo a diferentes moléculas e íons. Associar os resultados da prática ao processo de absorção iônica nas plantas.

### Materiais

- Levedo de pão (fermento de padaria)
- Solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 0,5% (p/v)
- Solução de vermelho-neutro a 0,02% (p/v)
- Solução de ácido clorídrico 0,02N
- Solução de ácido acético 0,02N
- Solução de hidróxido de sódio 0,02N
- Solução de hidróxido de amônio 0,02N
- Tubos de ensaio
- Estante para tubo de ensaio
- Funil de vidro
- Papel-filtro quantitativo (filtração lenta)

### Procedimentos

Prepare uma suspensão de levedo a 20% (p/v) em carbonato de sódio a 0,5% (p/v) e adicione 2 mL dessa suspensão em cinco tubos de ensaio. Adicione, a cada um dos cinco tubos, igual quantidade de solução de vermelho-neutro em água a 0,02% (p/v). No sexto tubo, adicione carbonato de sódio e, depois, vermelho neutro em quantidades iguais. Observe, anote e interprete os resultados, considerando a coloração das soluções nos tubos de ensaio desde o início da adição do vermelho neutro até a sua chegada ao vacúolo.

Faça agora os seguintes testes:

1) Filtre o conteúdo do tubo 1 e observe a cor do material retido no papel-filtro. Adicione ao filtrado do primeiro tubo, 1 mL de solução de vermelho-neutro e registre o ocorrido.

2) Ferva em banho-maria o tubo 2 com o respectivo conteúdo e observe o que acontece. Explique o resultado.

3) Adicione 3 mL de solução de hidróxido de sódio 0,02 N ao tubo 3 e observe o resultado.

4) Acrescente 4 mL de solução de hidróxido de amônio 0,02 N aos tubos 4 e 5 e observe os resultados.

5) Aos tubos 4 e 5, já com hidróxido de amônio, acrescente, respectivamente, 2 mL de ácido clorídrico 0,02 N e 2 mL de ácido acético 0,02 N. Observe as mudanças de cor das soluções indicadoras nesses tubos e interprete o conjunto de resultados.

Na interpretação dos resultados, além de levar em consideração a estrutura das membranas celulares, tenha em mente que, em solução aquosa, o carbonato de sódio (base forte), o ácido clorídrico (ácido forte) e o hidróxido de sódio (base forte) estão em estado predominantemente ionizado. Em contraste, o ácido acético (ácido fraco), o hidróxido de amônio (base fraca) e o vermelho-neutro encontram-se, predominantemente, na forma molecular.

### Questionário

1. Por que o vermelho-neutro adquire a coloração de reação ácida ao ser adicionado à suspensão de levedo em carbonato de sódio, uma substância de reação básica? Qual é o tempo para a mudança de coloração?

2. Sabendo que todos os íons utilizados no experimento são monovalentes, como você explica a penetração mais rápida do íon potássio em relação ao sódio?

3. Por que moléculas de peso molecular relativamente baixo atravessam mais rapidamente as membranas celulares do que íons de peso semelhante?

4. A uma suspensão de levedo preparada em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,5% foi adicionada uma solução de vermelho-neutro. Em seguida a mistura foi fervida. Por que a solução apresentou coloração amarela após a fervura?

5. Uma suspensão de levedo foi misturada com uma solução de vermelho-neutro, adquirindo uma coloração avermelhada. Com a adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,02 N), tornou-se amarelada imediatamente. O que você concluiu quanto ao pH do suco celular e à permeabilidade das membranas ao  $\text{NH}_4\text{OH}$ ?

6. Por que, para a execução deste experimento, é imprescindível a utilização do vermelho-neutro?

7. Supondo que haja quatro tipos de partículas, AB,  $\text{C}^+$ ,  $\text{D}^{++}$  e  $\text{E}^{+++}$ , e que a penetração dessas partículas numa membrana celular se dê por difusão simples, qual será a ordem decrescente de penetração e por quê?

8. Que tipo de informação essa aula pode fornecer em relação à absorção dos íons pelas plantas?

## Prática 4.4 - Determinação do Potencial Osmótico de Tecidos Vegetais pelo Método Plasmolítico

### Introdução

Nos sistemas biológicos ou quando imersos em soluções aquosas, tecidos vegetais podem entrar em equilíbrio, ganhar ou perder água para o meio externo. O potencial osmótico é uma estimativa da quantidade de solutos presentes em solução. Quando solutos são mantidos no interior de uma membrana semipermeável, é possível a ocorrência de osmose. A pressão osmótica pode ser definida como a pressão necessária para impedir que a osmose ocorra, ou seja, a pressão equivalente aplicada sobre um recipiente contendo um solvente puro de modo a impedir a ocorrência da osmose.

A pressão osmótica de uma solução aquosa diluída pode ser calculada pela equação de Vant'Hoff, descrita a seguir:

$$\pi = \frac{n_s}{V} . R.T = R.T.C_s$$

Na equação,  $\pi$  representa a pressão osmótica,  $n_s$  o número de moles do soluto,  $V$  o volume da solução,  $R$  a constante dos gases ideais ( $8,32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta em Kelvin ( $273+^{\circ}\text{C}$ ) e  $C_s$  a concentração molal do(s) soluto(s).

Outro fator que pode interferir no movimento da água nas plantas é a pressão de parede (**P**), também denominada pressão de turgescência. Se a pressão do sistema estiver acima da pressão padrão, o valor de **P** será positivo, caracterizando uma célula túrgida, devido à resistência imposta pela parede e membranas internas à deformação causada pela variação do volume celular, ocasionada pela entrada de água. Quando a pressão de parede assume valor igual a zero ou um valor negativo, a

célula perde turgescência, tornando-se flácida pela saída da água. Nessa condição, considera-se que a célula está plasmolisada (murcha).

A determinação do potencial osmótico pelo método de plasmólise incipiente (início de plasmólise) se baseia no fato de que, nessa condição, a solução plasmolisante externa e o suco celular têm a mesma pressão osmótica. Sendo a pressão de parede (**P**) nesse ponto igual a zero e desprezando-se o valor da pressão mátrica ( $\tau$ ), os valores dos potenciais hídricos ( $\Psi_w$ ) da solução externa e do suco celular também são iguais. O problema para o caso de uma única célula resume-se, então, em encontrar uma solução que provoque a plasmólise incipiente, ou seja, o estado fisiológico no qual a pressão da parede começa a equivaler a zero. Para o caso de tecidos, considera-se que a plasmólise incipiente manifesta-se quando 50% das células encontram-se plasmolisadas.

### Objetivos

Determinar a pressão osmótica de um tecido foliar empregando o método plasmolítico ou de plasmólise incipiente.

### Materiais

- Soluções de sacarose (342,3 g / mol) nas concentrações 0,08 M; 0,10 M; 0,12 M; 0,14 M; 0,16 M 0,18 M 0,20 M; 0,22 M; 0,24 M e 0,24 M
- Lâminas e lamínulas para microscopia
- Papel absorvente
- Lâmina de barbear (gilete)
- Microscópio
- Placa de toque ou vidro de relógio
- Folhas de plantas da família Commelinaceae, como, por exemplo, *Tradescantia pendula* Heynh. (Zebrina) ou *Tradescantia spathacea*

Sw. (Abacaxi-roxo), *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt (trapoeraba-roxa).

## Procedimentos

Para cada solução, faça pelo menos três cortes paradérmicos da superfície abaxial de uma das plantas sugeridas, com cerca de  $1 \text{ cm}^2$ , e coloque-os em placa de toque ou em outro recipiente contendo soluções de sacarose a 0,08 M; 0,10 M; 0,12 M; 0,14 M; 0,16 M; 0,18 M; 0,20 M; 0,22 M; 0,24 M e 0,26 M, em volumes suficientes para cobrir os cortes. Mantenha os cortes submersos por 30-40 minutos.

Após esse intervalo, os cortes devem ser transferidos para sistema de lâmina e lamínula e observados em microscópio óptico. Procure uma região que apresente um maior número de células coloridas. Conte o número de células vermelhas túrgidas e de células vermelhas plasmolisadas em cada solução de sacarose, determinando a porcentagem de células plasmolisadas em cada uma delas. Construa um gráfico em que na abscissa estejam as concentrações das soluções de sacarose e, na ordenada, a porcentagem de células plasmolisadas. Identifique, então, utilizando a Tabela 1, que relaciona as molaridades das soluções de sacarose às suas pressões osmóticas, a solução de sacarose correspondente ou equivalente ao ponto de plasmólise incipiente ( $P \rightarrow 0$ ).

**Tabela 1.** Pressões Osmóticas de Soluções Molares de Sacarose a 20°C, em MPa (0, l MPa = l bar = 0,987 atm):

MOLA- RIDADE	SEGUNDAS DECIMAIS									
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,000	0,026	0,054	0,080	0,107	0,134	0,161	0,187	0,214	0,241
0,1	0,267	0,295	0,321	0,347	0,375	0,401	0,427	0,454	0,481	0,508
0,2	0,536	0,564	0,594	0,622	0,650	0,679	0,707	0,736	0,765	0,794
0,3	0,823	0,852	0,882	0,912	0,941	0,970	1,000	1,033	1,064	1,094
0,4	1,124	1,155	1,185	1,226	1,256	1,287	1,317	1,347	1,388	1,418
0,5	1,449	1,479	1,520	1,550	1,580	1,621	1,661	1,692	1,732	1,763
0,6	1,803	1,834	1,874	1,915	1,945	1,985	2,026	2,067	2,097	2,137
0,7	2,178	2,218	2,259	2,300	2,340	2,411	2,462	2,462	2,502	2,543
0,8	2,583	2,634	2,674	2,715	2,755	2,796	2,836	2,877	2,917	2,968
0,9	3,009	3,059	3,110	3,150	3,201	3,252	3,302	3,353	3,404	3,454
1,0	3,505	3,556	3,616	3,667	3,718	3,768	3,819	3,870	3,930	3,981

## Questionário

1. Explique os termos plasmólise, deplasmólise e plasmoptise.
2. Defina o termo “plasmólise incipiente”.
3. Porque somente em plasmólise incipiente é possível a determinação da pressão osmótica de um tecido? Por que outro grau de plasmólise qualquer não poderia ser utilizado para medir esse parâmetro?
4. Por que em plasmólise incipiente a pressão osmótica da célula é igual à pressão osmótica da solução externa?
5. Na determinação da pressão osmótica das células nos tecidos da planta utilizada no método plasmolítico, você chegou a um valor equivalente a uma solução de 0,22 M de sacarose.

- a) Qual é o valor da pressão de parede das células em plasmólise incipiente?  
b) Qual é o potencial hídrico das células nessa mesma condição?

6. A pressão osmótica da célula em plasmólise incipiente tem o mesmo valor que a pressão osmótica da célula em sua condição inicial (normal)? Explique.

7. Qual é o valor do potencial de parede de uma célula bastante plasmolisada? Ele alcança um valor negativo? Explique.

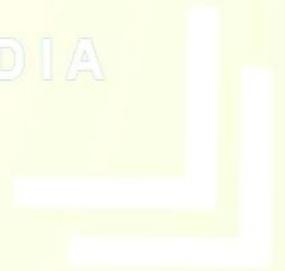
8. Quais são as principais vantagens e desvantagens do método plasmolítico para determinar a pressão osmótica do tecido?



# FISILOGIA

# VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 4.5 - Determinação do Potencial Hídrico em Tecidos Vegetais pelo Método Densimétrico (Schardakow)

### Introdução

A permeabilidade seletiva das membranas possibilita que a água e substâncias pequenas e desprovidas de carga movimentem-se através da sua estrutura. A osmose, processo pelo qual um solvente se movimenta através de uma membrana semipermeável da solução mais diluída para a mais concentrada, permite que os tecidos se mantenham em equilíbrio hídrico, uma vez que o movimento da água será sempre da região de maior potencial hídrico para a de menor potencial hídrico.

Em função dos processos osmóticos e das consequentes movimentações da água, quando tecidos vegetais encontram-se imersos em água ou em soluções (diluídas ou concentradas), fluxos de água para dentro ou para fora das células podem promover alterações nas concentrações e, conseqüentemente, nas densidades das soluções externas.

O método empregado na aula se baseia na transferência líquida de água entre amostras de tecido vegetal e soluções-teste com pressões osmóticas conhecidas. As transferências determinam alterações nas densidades das soluções-testes, que aumentam, diminuem ou permanecem invariáveis, conforme o potencial hídrico das soluções externas seja maior (hipotônica), menor (hipertônica) ou igual (isotônica) ao potencial hídrico dos tecidos.

### Objetivos

Determinar o potencial hídrico de um tecido foliar utilizando o método densimétrico (Schardakow).

### Materiais

- Solução de sacarose a 0,01 M; 0,02 M; 0,03 M; 0,04 M; 0,05 M; 0,06 M; 0,07 M; 0,08 M; 0,09 M e 0,10 M
- Tubos de ensaio pequenos (1,5 x 12,5 cm)
- Azul de metileno (cristais)
- Pipeta de ponta capilar (pipeta de Pasteur)
- Perfurador de rolhas
- Folhas de plantas de beijo (*Impatiens balsamina* L., Balsaminaceae)

### Procedimentos

Coloque 2 mL de cada uma das soluções de sacarose a 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,10 M em tubos de ensaio e uma mesma série paralela de soluções em outros tubos de ensaio. A série paralela não receberá tecidos foliares. Do material indicado pelo instrutor, tome pequenos fragmentos de folhas (discos foliares cortados com um perfurador de rolhas) e coloque-os em cada um dos tubos de ensaio ( $\pm$  20 discos/tubo), submergindo-os nos 2 mL das soluções de sacarose.

Após 1-2 horas, adicione cristais de azul de metileno em cada tubo e agite, a fim de colorir as soluções que estiveram em contato com os fragmentos. Com uma pipeta de ponta capilar (Pasteur), recolha um pouco de cada solução colorida e solte-a lentamente no meio da solução de igual concentração e que permaneceu sem fragmentos nos tubos da série paralela.

Observe, contra uma fonte de iluminação, se a gota se desloca para cima, para baixo ou se permanece mais ou menos estacionada, conforme o potencial hídrico do material estudado seja superior, inferior ou igual ao da solução em que eles estiveram submersos. Caso a gota colorida não fique estacionada em qualquer das soluções teste, pode-se

repetir o ensaio utilizando uma série de soluções cujas concentrações sejam intermediárias entre aquelas em que a gota desceu e subiu, respectivamente.

Determine o potencial hídrico do tecido em MPa, consultando a Tabela 1, que relaciona as molaridades das soluções de sacarose às suas pressões osmóticas.

**Tabela 1.** Pressões Osmóticas de Soluções Molares de Sacarose a 20°C, em MPa (0,1 MPa = 1 bar = 0,987 atm):

MOLA- RIDADE	SEGUNDAS DECIMAIS									
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,000	0,026	0,054	0,080	0,107	0,134	0,161	0,187	0,214	0,241
0,1	0,267	0,295	0,321	0,347	0,375	0,401	0,427	0,454	0,481	0,508
0,2	0,536	0,564	0,594	0,622	0,650	0,679	0,707	0,736	0,765	0,794
0,3	0,823	0,852	0,882	0,912	0,941	0,970	1,000	1,033	1,064	1,094
0,4	1,124	1,155	1,185	1,226	1,256	1,287	1,317	1,347	1,388	1,418
0,5	1,449	1,479	1,520	1,550	1,580	1,621	1,661	1,692	1,732	1,763
0,6	1,803	1,834	1,874	1,915	1,945	1,985	2,026	2,067	2,097	2,137
0,7	2,178	2,218	2,259	2,300	2,340	2,411	2,462	2,462	2,502	2,543
0,8	2,583	2,634	2,674	2,715	2,755	2,796	2,836	2,877	2,917	2,968
0,9	3,009	3,059	3,110	3,150	3,201	3,252	3,302	3,353	3,404	3,454
1,0	3,505	3,556	3,616	3,667	3,718	3,768	3,819	3,870	3,930	3,981

## Questionário

1. Qual é o fundamento do método de Schardakow, de determinação do potencial hídrico de tecidos vegetais?
2. Por que o método de Schardakow, de determinação do potencial hídrico, é também denominado método densimétrico?

3. Em folhas de zebrina encontrou-se, pelo método densimétrico, um potencial hídrico de - 0,3 MPa. Em plasmólise incipiente, o mesmo tecido apresentou uma pressão osmótica de + 0,2 MPa. Considerando que não tenha havido alteração no volume celular, pergunta-se:

- a. Qual a pressão de turgescência ( $\Psi_p$ ) do tecido (potencial de pressão)?
- b. Esse tecido ficaria túrgido se fosse colocado em água pura? Por quê?

4. Você pode, com esse método, determinar o valor da pressão osmótica das células? Explique.

5. Qual é a função do azul-de-metileno nesse exercício? Se o tecido usado fosse de beterraba, haveria necessidade desse corante?

6. Quais equipamentos podem ser utilizados com maior precisão para indicar o potencial hídrico dos tecidos e o momento ideal para irrigar, evitando o desperdício de água e a queda na produção agrícola?

7. Quais são as vantagens e desvantagens do método densimétrico na determinação do potencial hídrico de tecidos vegetais?

## Prática 4.6 - Relações Energéticas da Embebição

### Introdução

A adsorção da água por colóides que participam de sistemas físicos (papel, amido ou solo) ou biológicos (células vivas) denomina-se embebição. A embebição é resultante da interação entre moléculas de água e superfícies sólidas. A redução da energia livre da água em razão de fenômenos de superfície (embebição, adsorção, capilaridade) é medida pelo potencial mátrico ( $\Psi_m$ ).

As forças de embebição são muito intensas. Superfícies higroscópicas como as de gelatinas, do amido, de madeiras ou do solo, apresentam água residual (água higroscópica) fortemente aderida, com potencial hídrico bastante negativo (-100 a -300 MPa). Os materiais que possuem superfícies molháveis e elevada superfície interna, devido à presença de poros, são denominados matrizes. Quando essas superfícies encontram-se secas e são reidratadas, há um grande aumento no volume, uma vez que a água não pode ser comprimida. O aumento de volume é tão intenso que nem mesmo rochas ígneas são capazes de impedi-lo.

Nas células dos vegetais, existem colóides hidrofílicos nas paredes celulares, no protoplasma (parte viva da célula, incluindo o citoplasma e o núcleo), no vacúolo e, também, em outras estruturas como, por exemplo, no amido. Todas essas estruturas adsorvem e retêm água por embebição. As moléculas de água unem-se umas às outras (coesão) e também são atraídas por superfícies carregadas eletricamente (adesão). Nas paredes celulares, a celulose é depositada formando microfibrilas, que, por sua vez, formam as fibras de celulose. A parede celular compreende um volume semi-rígido com espaços vazios (poros) entre as fibras de celulose. Esse material se embebe com água devido à presença de poros com diâmetro muito reduzido. Esses poros atuam como capilares, aumentando a capacidade de retenção de água.

O amido, como qualquer carboidrato, adsorve prontamente a água devido aos pólos negativos condicionados pela posição do oxigênio, na porção mais externa da molécula, e pela sua elevada eletronegatividade. Como a eletrosfera da molécula de água é assimétrica, também devido à elevada eletronegatividade do oxigênio, os pólos positivos da água (próximos aos átomos de hidrogênio) são fortemente atraídos pelos pólos negativos do carboidrato. Quando o amido seco sofre embebição, parte da energia livre (ou atividade) da água é reduzida pela presença de uma grande extensão de superfícies de interação, aparecendo no sistema na forma de calor.

### Objetivos

Observar a variação da temperatura de moléculas de amido em função da hidratação e estimar o potencial mátrico aproximado.

### Materiais

- Amido de milho (Maizena<sup>®</sup>) hidratado (mantido no ambiente)
- Amido de milho desidratado (mantido sob dessecação, em presença de sílica gel azul ou outro agente dessecante ou seco em estufa, por 2h, a 105°C)
- Água quente
- Água fria
- Tubos de ensaios (12,5 x 1,5 cm)
- Pipeta de 5 mL
- Termômetro
- Dessecador, sílica gel ou estufa de secagem

## Procedimentos

Em um béquer, coloque uma camada de amido de milho de 2,0 a 3,0 cm de altura. Mergulhe o bulbo de um termômetro na massa de amido e anote a temperatura. Em um copo à parte, misture água quente e fria até obter a mesma temperatura observada no amido. Adicione ao béquer cerca de 3 mL dessa água e observe imediatamente a variação de temperatura. Continue observando até que a temperatura atinja o valor máximo. Repita o mesmo procedimento, dessa vez, utilizando amido previamente desidratado. Analise e interprete os resultados considerando que um aumento de temperatura de  $0,03^{\circ}\text{C}$  corresponde a uma pressão mátrica de 3,4 MPa.

## Questionário

1. No que consiste a adsorção?
2. Por que, ao se adicionar água ao amido desidratado, ocorreu aumento da temperatura? Qual é a fonte da energia calorífica desprendida?
3. O resultado dessa prática permite estimar a pressão mátrica do amido. É sabido que, durante a embebição, um aumento da temperatura de  $0,03^{\circ}\text{C}$  corresponde a uma pressão de 3,4 MPa. Qual seria a pressão que se deveria aplicar à amostra de amido para evitar sua expansão devido ao fenômeno da embebição?
4. Por que quando se coloca água em amido desidratado a temperatura do sistema aumenta muito mais do que quando se adiciona água em amido hidratado?
5. Qual é o processo envolvido na absorção de água pelas sementes nas primeiras horas de germinação?
6. Qual é a origem das forças que fazem com que as sementes consigam germinar em estradas, rompendo inclusive a camada asfáltica?
7. Como você explica que sementes muito desidratadas consigam remover água da atmosfera (em forma de vapor)?
8. Por que as sementes não se dessecam completamente se expostas às condições atmosféricas normais?
9. Como podemos fazer para determinar o potencial mátrico da celulose pulverizada?
10. Por que é necessário o armazenamento de folhas de papel em estufas ou próximas a uma lâmpada incandescente antes de colocá-las em máquinas copiadoras?
11. Por que a celulose se embebe facilmente com água?
12. Considerando os resultados da aula, explique como a água é retida por adsorção na matriz do solo e por que os solos arenosos apresentam valores de capacidade de campo menores do que os solos siltosos ou argilosos?

## Prática 4.7 - Força Mecânica Causada pela Embebição de Sementes

### Introdução

Corpos formados por superfícies molháveis e com grande superfície interna de contato com a água formam matrizes que aumentam de volume quando embebidas. O solo, assim como blocos de gesso, retém água em seus capilares, funcionando como matrizes. Quando essas superfícies encontram-se secas e são reidratadas, há um grande aumento no volume, uma vez a molécula da água não pode ser comprimida. Esse aumento de volume é tão intenso que nem mesmo rochas ígneas são capazes de impedi-lo.

As sementes apresentam grandes quantidades de amido em seus endospermas. Como qualquer carboidrato, o amido adsorve prontamente a água devido aos pólos negativos condicionados pela posição do oxigênio na porção mais externa da molécula. Como a eletrosfera da molécula de água é assimétrica e, também, devido à eletronegatividade do oxigênio, os pólos positivos da água (próximos aos átomos de hidrogênio) são fortemente atraídos pelos pólos negativos do amido. A entrada de água na massa de amido armazenada no endosperma aumenta o volume das sementes. Se as sementes estiverem envolvidas por um material rígido e de reduzida resistência à compressão, como o gesso, por exemplo, esse material será facilmente rompido.

### Objetivos

Demonstrar o desenvolvimento de forças mecânicas decorrentes da embebição de sementes e evidenciar as consequências da atuação dessas forças durante a germinação.

### Materiais

- Sementes de feijão
- Béquer de 250 mL
- Bastão de vidro
- Gesso em pó
- Funil de vidro ou de plástico
- Papel-filtro (15 cm de diâmetro)
- Placa de Petri

### Procedimentos

Caso seja utilizado um funil de vidro, pegue uma folha de papel-filtro, dobrando-a para que a mesma tome o formato cônico. Coloque o papel-filtro no interior do funil de vidro para que o gesso não grude nas paredes. Para a obtenção da massa de gesso, utilize um béquer de 250 mL. Adicione 75 mL de água destilada ou de torneira no béquer. Adicione o pó de gesso aos poucos. Com um bastão de vidro ou espátula, mexa vigorosamente a massa, adicionando gesso até a mistura obter uma consistência pastosa e plástica uniforme. Com a massa de gesso preparada, encha o funil de plástico ou de vidro (revestido com papel-filtro) até a metade de seu volume. Coloque entre 10 a 15 sementes de feijão sobre a massa que cobre a metade do volume do funil. Em seguida, complete imediatamente o volume do funil com o restante da massa de gesso, cobrindo totalmente as sementes. O volume formado é um cone de gesso com sementes no seu interior. Faça pequenos movimentos batendo levemente com o funil para que o gesso fique completamente uniforme. Espere a massa de gesso endurecer. O cone geralmente esquenta no início do processo de secagem. Quando estiver seco, retire-o do funil, descartando o papel-filtro em volta do cone.

Coloque a base do cone de gesso sobre uma placa de Petri com um pouco de água. O volume de gesso formado é poroso e a água

entrará nos poros do cone, embebendo-o. As sementes que estão no cone também serão embebidas pela água que sobe através dos capilares de gesso. Deixe o cone de gesso com a base submersa em água na placa de Petri por, no mínimo, uma hora. Observe a ocorrência de rachaduras no gesso. Após 1-2 hora, retire a água da placa de Petri e espere a ocorrência de rachaduras maiores. Mantenha o cone de gesso próximo a uma fonte de luz em uma placa de Petri com água por uma a duas semanas e acompanhe o desenvolvimento das plântulas de feijão.

### Questionário

1. A eletrosfera assimétrica da molécula de água é causada pela diferença de eletronegatividade entre os átomos de oxigênio (eletronegatividade = 3,5) e hidrogênio (eletronegatividade = 2,1). Represente a fórmula estrutural da água, com a eletrosfera deslocada e os dois pólos positivos (+) próximos aos átomos de hidrogênio e o pólo negativo (-) próximo ao átomo de oxigênio. O ângulo médio entre as ligações oxigênio e hidrogênio é de  $105^\circ$ .
2. Observe a fórmula estrutural da celulose e a posição dos átomos de oxigênio. Por que uma matriz de celulose se embebe facilmente em água?
3. Verifique a posição dos átomos de oxigênio na rede cristalina formada principalmente pelo oxigênio e silício no solo. Por que a água é adsorvida na superfície dessa rede cristalina?
4. Como ocorre a adsorção das moléculas de água pela matriz do endosperma de uma semente ou pela matriz de uma parede celular?
5. Explique por que solos arenosos apresentam valores de capacidade de campo menores que solos siltosos ou argilosos.
6. Calcule a capacidade de campo dos seguintes solos secos ao ar livre, considerando que VS = volume de água colocado sobre a superfície do solo e VD = volume de água coletado sob o solo após drenagem.
  - a) 500 mL de solo, VS = 500 mL, VD = 250 mL
  - b) 1000 mL de solo, VS = 1500 mL, VD = 350 mL
  - c) 1500 mL de solo, VS = 1500 mL, VD = 500 mL
7. Qual dos três solos (a, b ou c da questão 6) apresenta, em média, capilares com maior diâmetro?
8. Explique como o simplasto e o apoplasto (no caso parede celular, uma matriz) encontram-se em equilíbrio hídrico.

## 5 - ABSORÇÃO, TRANSLOCAÇÃO E PERDA DE ÁGUA PELAS PLANTAS

A divisão de funções nos organismos multicelulares requer um sistema eficiente de transporte a longas distâncias, tanto para os produtos fotossintéticos quanto para as matérias-primas necessárias à manutenção e ao crescimento das plantas. Nas plantas, os sistemas de transporte a longas distâncias são o floema, que transporta solutos orgânicos, nas direções basípeta e acrópeta, e o xilema, onde se movimentam água e solutos inorgânicos na direção da corrente transpiratória. Solutos inorgânicos também podem se mover no floema, assim como os orgânicos podem ser transportados no xilema. Além disso, é possível a transferência lateral de água e solutos entre os dois sistemas de condução.

No xilema, o fluxo da seiva ocorre em resposta ao gradiente de potencial hídrico gerado pela transpiração ou "corrente transpiratória". No floema, o fluxo tem como força motora o gradiente de pressão hidráulica (ou pressão de turgescência). Esse gradiente é formado pela entrada de solutos (carregamento) nos terminais do floema nas fontes, especialmente folhas, com consequente absorção de água (por osmose), e pela saída dos solutos (descarregamento) dos terminais do floema localizados nos drenos, com perda de água para os tecidos adjacentes. A seiva do floema encontra-se normalmente sob pressão positiva, enquanto que a do xilema se mantém na maior parte do tempo sob tensão (pressão negativa).

O fluxo de vapor de água no contínuo solo-planta-atmosfera ocorre na forma líquida, no solo e na planta, e na forma de vapor, da planta para a atmosfera. Se o ar não está normalmente saturado, o fluxo ocorre na direção solo-atmosfera. Na verdade, os potenciais hídricos na atmosfera são muito baixos, o que gera a força motora para o transporte de água no sistema, uma vez que as partes úmidas expostas, particularmente as folhas, ao perderem água, têm o seu potencial hídrico

reduzido. Forma-se assim um gradiente de potencial hídrico decrescente, do solo para a atmosfera, com um fluxo de água na mesma direção. Todavia, o fluxo não depende unicamente das diferenças de potenciais (gradientes), mas também das resistências encontradas no percurso. Em qualquer seção do percurso, o fluxo ( $J_w$ ) é proporcional à diferença de potenciais ( $\Delta\Psi$ ) e inversamente proporcional às resistências ( $R$ ), conforme a equação a seguir:

$$J_w = \frac{-\Delta\Psi}{\Sigma R}$$

Na fase gasosa, o fluxo de água é diretamente proporcional à diferença de concentrações (pressões do vapor) e não à diferença de potenciais, visto que os potenciais não são linearmente relacionados às concentrações. Em equilíbrio, ou seja, quando a absorção e a perda de água se equivalem, o fluxo é igual em qualquer das seções do sistema. Se as resistências são diferentes nas várias partes da cadeia, as quedas de potenciais necessárias para mover a água, em cada seção, também deverão ser diferentes.

A resistência no solo é medida geralmente por sua recíproca, a condutância hidráulica. Na planta, a resistência total é a soma de diversas resistências (fluxos em série) e condutâncias (fluxos paralelos), algumas na fase líquida, outras na fase gasosa (mesófilo, epiderme). A resistência do ar corresponde àquela da camada de ar estacionário, ou camada limítrofe, localizada entre a superfície foliar e o ar turbulento.

Os fatores que afetam a absorção e a perda de água pela planta atuam modificando os potenciais ou fazendo variar as resistências. Ordinariamente, as resistências suscetíveis a variações são a resistência estomática e a resistência do ar (camada limítrofe). A resistência principal é a estomática, por ser a única regulável pela planta e que pode exercer certo grau de controle sobre a transpiração.

A resistência estomática age em paralelo com a resistência cuticular (soma de condutâncias), constituindo a resistência epidérmica. Como a resistência cuticular é muito alta (baixa condutância), sua contribuição no controle do fluxo de vapor de água (transpiração) é negligenciável. Daí o

fato de a transpiração estomática representar a maior parte da transpiração total.

Além da perda de água por evaporação (transpiração), as plantas também podem perder água na forma líquida (gutação ou sudação). Embora não ocorra em todas as plantas, esse fenômeno é mais facilmente observável em certas espécies herbáceas e em espécies arbóreas de pequeno porte, sob condições de suprimento abundante de água e transpiração reduzida.



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.1 - Absorção e Perda de Água pelas Plantas

### Introdução

A teoria mais aceita para explicar o fluxo de seiva xilemática nas plantas foi proposta por Dixon e Joly, em 1895 e é conhecida como teoria tenso-coeso-transpiratória, teoria da tensão-coesão ou teoria de Dixon e Joly. Nas plantas, a perda de água na forma de vapor para a atmosfera é denominada transpiração. Ela ocorre por difusão, das câmaras subestomáticas para o meio externo. A força dirigida para a ocorrência da transpiração é o gradiente absoluto de concentração de vapor de água entre as folhas e a atmosfera.

A água, durante a absorção, pode seguir dois caminhos através das raízes: o apoplasto, que constitui os espaços intercelulares e de paredes celulares e o simplasto, que corresponde ao contínuo citoplasmático, propiciado pela existência dos plasmodesmos. O apoplasto (espaço livre aparente) é limitado pela endoderme, uma camada de células existente nas raízes e localizadas entre o córtex e o estelo. A endoderme, em função da deposição de suberina (molécula impermeável à água) ao longo da superfície das suas células, forma uma barreira à livre penetração da água, sendo essa barreira denominada "Faixa ou Estria de Caspari".

A absorção da água está condicionada ao potencial hídrico do solo e dos tecidos das raízes. As células de parênquima localizadas ao redor dos tecidos de condução acumulam grandes quantidades de íons. A absorção iônica, especialmente dos ânions, ocorre com gasto de energia (transporte ativo). O acúmulo desses íons faz com que as células do parênquima das raízes tenham seu potencial osmótico reduzido. Como consequência, o potencial hídrico dessas células também reduz, alcançando valores menores do que o potencial hídrico do solo. Em função disso, ocorre fluxo de água do solo para as raízes devido a pressão

osmótica. A presença da endoderme também impede que a solução absorvida (água + íons) retorne ou extravase para o solo.

### Objetivos

Evidenciar a importância das raízes para a absorção de água e elementos minerais do solo.

### Materiais

- Plantas de beijo (*Impatiens balsamina* L., Balsaminaceae)
- Provetas de vidro de 1000 mL
- Água
- Óleo de soja ou de outra fonte vegetal

### Procedimentos

Desenterre um exemplar médio de uma planta de beijo cuidadosamente para não quebrar as suas raízes. Retire a terra, lave bem a planta e coloque-a em uma proveta graduada, com água. Para evitar a evaporação, pingue algumas gotas de óleo vegetal na proveta e anote a altura da água. Em outra proveta com água, do mesmo tamanho, coloque outra planta de tamanho similar, porém com raízes cortadas. Coloque também nessa proveta o óleo vegetal e anote a altura da água. Acompanhe as variações no nível da água nas provetas e as condições das plantas durante 1-2 semanas. Ao final desse período, interprete os resultados.

### Questionário

1. A absorção é a única função desempenhada pelas raízes?
2. Explique como a transpiração influencia a absorção pelas raízes.

3. Além de água, as raízes também absorvem os sais minerais. Explique como esse processo ocorre.

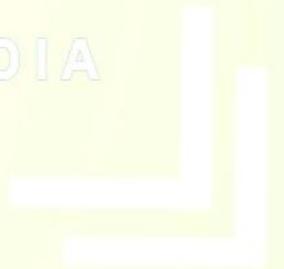
4. Quais são os caminhos que a água pode seguir em uma planta durante a sua absorção?

5. O que são as micorrizas e como elas podem interferir na absorção de água e nutrientes pelas raízes?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.2 - Recuperação da Turgescência em Ramos Cortados

### Introdução

O xilema é o tecido condutor responsável pelo transporte de água e sais minerais nas plantas. Nesse sistema, o fluxo de seiva é explicado pela teoria tenso-coeso-transpiratória (teoria da tensão-coesão ou teoria de Dixon e Joly). Os principais pressupostos dessa teoria consideram que a água encontra-se em estado líquido desde os capilares do xilema, nas raízes, até seus terminais (traqueídeos) no mesófilo foliar; que as perfurações do xilema permitem evaporação da água (formação de bolhas de vapor de água), mas impedem a penetração de ar externo (devido à hidratação dos vasos do xilema); que as colunas persistem no xilema por coesão (atração entre moléculas de água) e por adesão (atração pelas paredes do tubo); e que a energia para o processo é a transpiração nas folhas (ou o gradiente absoluto de concentração de vapor de água), não havendo consumo de energia para que o fluxo xilemático ocorra (mecanismo passivo).

Embora uma das pressuposições dessa teoria considere que a manutenção da integridade da coluna de água é fundamental para a ocorrência do transporte, a tensão gerada pela transpiração pode provocar quebras, resultando em cavitação (formação de pequenas bolhas de ar) e/ou embolia (preenchimento dos vasos ou traqueídeos com ar ou vapor). Esses fenômenos impedem ou dificultam o fluxo de seiva no vaso onde houve a interrupção da coluna de água. A cavitação pode ser eliminada pela pressão radicular, que expulsa as bolhas, ou pela própria redução na temperatura, permitindo que as bolhas se desfaçam e que a vaporização seja reduzida.

A força de coesão entre as moléculas de água impede, na maior parte dos casos, a ruptura da coluna de água. Além disso, o ar é impedido de chegar aos elementos traqueais, pois a tensão superficial que recobre

os poros das membranas de pontuação impede o fluxo interno de ar. Todavia, quando um ramo é seccionado por uma poda ou por algum dano mecânico, a entrada de ar é inevitável e o fluxo de água cessa devido à descontinuidade da coluna de água, interpondo grande resistência ao fluxo. Quando um dano mecânico é irreparável, os vasos do xilema são selados definitivamente pela formação de tiloses e/ou pela deposição de resina e gomas.

### Objetivos

Evidenciar a importância da manutenção da integridade dos vasos do xilema e a influência da presença de ar nesse tecido sobre o transporte da seiva xilemática. Ressaltar a importância desses fatores para a conservação em pós-colheita de flores de corte.

### Materiais

- Ramos de plantas de picão (*Bidens pilosa* L., Asteraceae) ou de caruru-de-porco (*Amaranthus viridis* L., Amaranthaceae) ou de outra espécie disponível
- Frascos de vidro
- Lâminas de barbear
- Trompa de vácuo ou bomba de vácuo
- Kitazato
- Massa de modelar

### Procedimentos

Corte quatro segmentos de ramos, de aproximadamente 15 a 20 cm, da planta disponível. Deixe-as murchar durante uma a duas horas sobre a bancada do laboratório. Quando os ramos estiverem tombando, por falta de turgescência, submeta-os aos seguintes tratamentos:

- Mergulhe a base do primeiro ramo em um frasco com água sem efetuar qualquer corte.

- Corte cerca de 5 cm da base do segundo ramo e mergulhe rapidamente o ramo em um frasco, como no caso anterior.

- Mergulhe em água a base do terceiro ramo e corte cerca de 5 cm dessa base (embaixo da água). Deixe-o absorvendo água no frasco.

- Caso exista uma bomba de vácuo disponível, coloque a base do quarto ramo em um frasco para vácuo (kitazato) contendo água até a metade. Tampe bem a abertura do frasco com plástico reforçado e aplique vácuo durante 5 minutos. Desligue o vácuo e deixe o ramo absorvendo água do próprio frasco.

Observe os quatro tratamentos continuamente, durante 1 a 30 minutos, anotando os sinais de recuperação. Explique as diferenças observadas.

### Questionário

1. Dentre os tratamentos aplicados, quais foram que recuperaram a turgescência dos ramos mais rapidamente?

2. Como você explica as diferenças na rapidez de recuperação da turgescência nesses tratamentos?

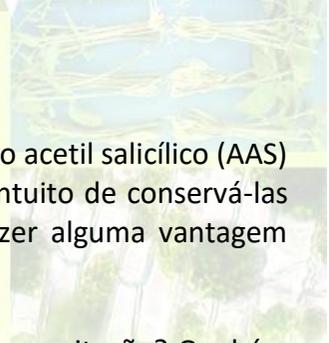
3. Como você poderia correlacionar os resultados da prática com a teoria tenso-coeso-transpiratória?

4. Tendo em vista as suas observações, que recomendações você faria a um floricultor, quanto ao período do dia mais indicado para colher flores? Que explicação você daria para justificar sua recomendação?

5. Como você trataria um ramo de flor para conservá-lo túrgido por mais tempo?

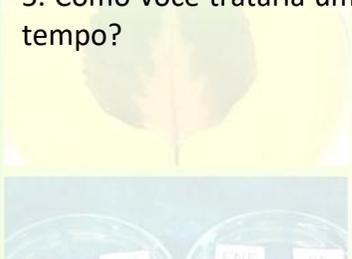
6. Algumas pessoas adicionam comprimidos de ácido acetil salicílico (AAS) e açúcar cristal aos jarros contendo flores com o intuito de conservá-las por mais tempo. Esses procedimentos podem trazer alguma vantagem para a conservação das plantas?

7. Quais são as principais diferenças entre embolia e cavitação? Qual é a influência desses fenômenos no transporte da seiva do xilema?



# BIOTECNOLOGIA VEGETAL

## UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.3 - Desenvolvimento de Tensões Internas no Xilema

### Introdução

Durante o dia, a absorção de água pelo sistema radicular não compensa as perdas pela transpiração foliar, o que provoca a diminuição do potencial hídrico. Como a água deve se manter coesa (teoria de Dixon e Joly), a queda no potencial hídrico das folhas é transmitida para os elementos de vasos do xilema, originando tensões internas. A contração dos troncos de muitas espécies durante o dia é uma evidência de que elas se encontram sob tensão. Qualquer fator que promova perda de água mais rapidamente do que absorção (falta de água no solo, por exemplo) leva ao desenvolvimento de tensões internas de diferentes magnitudes. Essas tensões podem alcançar valores de potencial hídrico muito baixos (valores muito negativos), o que pressupõe alta resistência mecânica dos vasos, impedindo seu colapamento.

Os tecidos do xilema são formados, basicamente, por dois tipos de células: traqueídeos e elementos de vasos. Os traqueídeos são longos, apresentam perfurações (pontuações areoladas) e extremidades fechadas. Os elementos de vaso são mais curtos, possuem extremidades abertas, que podem ser simples ou compostas, e, também, perfurações. Essas perfurações (pontuações) permitem a transferência lateral de água entre as células. Com a maturidade, os tecidos dos traqueídeos e dos elementos de vasos morrem, o que acontece devido à deposição de lignina durante a formação da parede secundária. A deposição de lignina nas paredes foi uma importante característica adaptativa que possibilitou a conquista do ambiente terrestre pelas plantas, uma vez que essa substância de natureza fenólica confere elevada força tênsil aos vasos do xilema, permitindo que eles resistam às elevadas pressões negativas (tensões) causadas pela transpiração excessiva.

### Objetivos

Demonstrar que, durante o dia, o tecido xilemático das plantas encontra-se sob diferentes níveis de tensão.

### Materiais

- Vasos com plantas jovens de girassol (com cerca de 30 cm de altura)
- Solução de azul de metileno a 1% (p/v)
- Lâmina de barbear
- Placas de Petri ou outro recipiente de lateral baixa
- Microscópio estereoscópico (lupa)

### Procedimentos

Prepare dois vasos com plantas de girassol. Após o desenvolvimento das plantas até o tamanho adequado, deixe um deles sob condição de déficit hídrico (não molhe durante 2-4 dias). Antes que as plantas sob déficit hídrico apresentem sintomas intensos de falta de água, coloque-as na posição horizontal, imergindo a porção mediana do caule na solução de azul de metileno contida em uma placa de Petri. Com uma lâmina de barbear, corte a haste da planta, mergulhando as seções na solução por um minuto. Retire imediatamente a parte terminal seccionada e remova rapidamente as folhas. Lave as porções seccionadas em água de torneira, enxugando-as com papel absorvente. Faça cortes transversais, de 2 mm de comprimento, ao longo das partes terminal e basal, a partir da região de contato com o corante.

Examine em lupa as superfícies seccionadas e determine a presença do azul de metileno nos feixes vasculares. Registre a distância máxima, a partir do seccionamento original, em que o menor indício de corante é observado em qualquer feixe, em direção ao ápice e à base.

Repita o procedimento com a planta mantida sob condições normais de irrigação (não submetida a déficit hídrico).

### Questionário

1. Em que tecido a solução de azul de metileno se movimenta?
2. Caso o sistema fosse puramente físico, sem células vivas, as observações seriam diferentes?
3. O que aconteceria se a experiência fosse realizada com plantas submetidas a diferentes graus de deficiência hídrica?
4. Dentre os tratamentos utilizados, em qual deles o corante atingiu maior distância? Como você explica esse resultado?
5. Quando se efetua um corte em um caule sob tensão interna de água, espera-se que o corante se desloque mais em direção ao ápice ou à base? Explique.
6. O que acontece com a seiva xilemática na parte basal da planta algum tempo após a secção do ramo?
7. Por que se desenvolvem maiores tensões internas de água nas plantas durante o dia do que durante a noite?
8. Observa-se que os diâmetros dos troncos de certas árvores contraem-se durante o dia. Como se explica esse fato?
9. As tensões internas do xilema podem alcançar valores de potencial hídrico muito negativo, mesmo assim não ocorre colapamento dos vasos. Como isso é possível?
10. Que outro método experimental poderia ser usado para provar que a perda de água na planta induz o desenvolvimento de tensões internas no xilema?
11. Que critério fisiológico poderia ser utilizado para diagnosticar deficiência de água no solo?
12. Por que as folhas de aboboreiras apresentam murcha durante o período da tarde, em dias quentes de verão, mesmo havendo boa disponibilidade de água no solo?

## Prática 5.4 - Gutação

### Introdução

A transpiração, processo pelo qual as plantas perdem água na forma de vapor para a atmosfera (através dos estômatos), é um dos principais mecanismos de controle da temperatura foliar. Todavia, quando a transpiração é baixa ou ausente, as plantas também podem perder seiva xilemática no estado líquido (gutação) através dos hidatódios, poros de abertura fixa encontrados nos bordos e pontas das folhas. Os hidatódios estão associados a um tecido parenquimatoso modificado (epitema), no qual os terminais do xilema (traqueídeos) extravasam a seiva. Em plantas apresentando gutação, os tecidos do xilema encontram-se sob pressão positiva.

A gutação somente ocorre quando a temperatura da atmosfera encontra-se amena e as umidades do ar (URar) e do solo estão elevadas. Tais condições reduzem a transpiração, possibilitando que as raízes absorvam água suficiente para preencher os vasos do xilema das raízes até os terminais (traqueídeos) nas folhas. Todavia, devido ao peso da coluna de água (pressão hidrostática), o limite máximo para a ocorrência da gutação (pressão radicular) é de aproximadamente 10 metros.

As plantas absorvem os elementos essenciais na forma ionizada. Após a absorção, cátions e ânions são armazenados nas células de parênquima das raízes (estelo). A endoderme, que limita essa região, não permite o retorno dos íons para o córtex da raiz. Como a concentração iônica nas células do estelo torna-se elevada, a pressão osmótica aumenta, criando condições para a absorção de grandes quantidades de água do solo. Todavia, o volume de água absorvido não pode ser armazenado nas células de parênquima. Em decorrência disso, essa solução (água e sais minerais, principalmente) extravasa diretamente para os vasos do xilema, preenchendo todo o seu volume/espço e ascendendo em direção à copa, exercendo pressão positiva sobre as paredes (pressão radicular), culminado com a sua perda, no estado

líquido (gutação), via hidatódios. Porém, o fenômeno da gutação desaparece quando a temperatura ambiente se eleva, a umidade relativa do ar diminui e a disponibilidade de água no solo reduz, uma vez que o fenômeno da transpiração passa a operar nessas condições, resultando novamente em pressões negativas no xilema.

### Objetivos

Avaliar as condições necessárias para a ocorrência do fenômeno da gutação. Compreender porque adubações excessivas podem resultar em morte das plantas. Evidenciar as consequências negativas da salinização dos solos.

### Materiais

- Copos de plástico (ou vasos) contendo plantas jovens (10 dias) de milho e de feijão
- Solução de sal de cozinha (NaCl) a 5% (p/v)
- Campânula de vidro

### Procedimentos

Prepare copos plásticos contendo plantas jovens de milho e de feijão. Regue um dos copos com solução de sal de cozinha a 5% e o outro com água de torneira. Cubra os copos com uma campânula de vidro e mantenha-os em um ambiente sombreado.

Observe durante uma semana as margens das folhas e também outras modificações ocorridas. Em dias com temperaturas amenas, gotas podem ser observadas nos bordos das folhas regadas com água logo após a montagem do experimento.

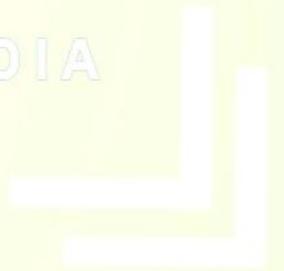
## Questionário

1. Por que não houve gutação no copo irrigado com solução salina?
2. Qual é a força responsável pela gutação? Como ela se origina?
3. Por que há necessidade de cobrir as plantas com uma campânula?
4. Por que não devemos fazer adubações excessivas aplicando quantidades de fertilizantes acima do recomendado nas análises de solos?
5. Por que a maioria das plantas não tolera solos salinos?
6. Descreva a estrutura típica de um hidatódio, fazendo um desenho e denominando os tecidos.



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.5 - Construção do Modelo de Fluxo por Pressão no Floema (Modelo de Münch)

### Introdução

Embora o transporte de seiva no floema tenha sido inicialmente associado à difusão, essa forma foi descartada quando foi observado que as velocidades de transporte da seiva eram muito elevadas, algo inviável para que a difusão pudesse explicar o fluxo em longas distâncias verificados nos tubos crivados. O transporte da seiva no floema é explicado pela teoria do fluxo em massa (fluxo por pressão), proposta pelo alemão Ernst Münch em 1930. Segundo essa teoria, os assimilados são transportados das fontes (folhas) para os drenos (frutos) em resposta a gradientes de pressão de turgor (ou pressão de turgescência) gerados osmoticamente.

A sacarose produzida nas células do mesofilo é secretada ativamente no interior dos tubos crivados das nervuras menores. Esse processo, denominado carregamento do floema, reduz o potencial hídrico no tubo crivado e faz com que a água que entra na folha através da corrente transpiratória (via xilema) se desloque por osmose para o tubo crivado. A hipótese do fluxo por pressão implica mecanismo passivo de transporte no floema sem, no entanto, desprezar o concurso de energia metabólica. O sistema para comprovar o modelo de Münch é de fácil construção e envolve a utilização de dois osmômetros interligados por um tubo em forma de “U”.

### Objetivos

Construir o modelo representativo do fluxo em massa por pressão, segundo a hipótese de Münch e observar o seu funcionamento. Associar os resultados obtidos ao transporte de seiva no floema.

### Materiais

- Solução de bicromato de potássio
- Solução de sacarose a 25% (p/v) ou açúcar cristal
- Pedacos de elástico (gominha de dinheiro ou *lastec*)
- Sacos de diálise (membrana artificial ou tripa artificial ou papel celofane incolor)
- Tubo de vidro em forma de “U”
- Vidros de maionese grandes ou béqueres de 500 mL

### Procedimentos

Coloque em água, por aproximadamente uma hora, duas tiras de membranas de diálise medindo 15 cm de comprimento cada uma. Amarre cuidadosamente uma das extremidades das tiras, de maneira a não deixar qualquer vazamento.

Encha um dos saquinhos com solução de sacarose concentrada (ou com 10 colheres de açúcar cristal) e amarre-o vigorosamente na parte terminal do tubo de vidro em forma de “U”. O outro saquinho de diálise contendo água pura deverá ser amarrado na outra extremidade do tubo de vidro.

Mergulhe o saquinho com sacarose em um vidro com água contendo bicromato de potássio (para colorir a água). O saquinho de diálise com água deve ser imerso em outro recipiente contendo água pura.

Disponha o conjunto de tal maneira que o vidro contendo o saquinho com sacarose fique em um nível inferior (cerca de 5 a 10 cm) em relação ao vidro do saquinho contendo apenas água. Observe o sistema em operação durante 1-2 horas.

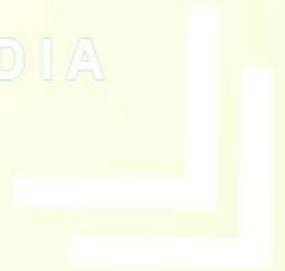
## Questionário

1. Como as três partes do modelo hipotético de Münch podem ser correlacionadas com as partes de uma planta viva?
2. Qual é o papel do bicromato de potássio colocado no recipiente contendo sacarose?
3. Na hipótese do fluxo em massa (modelo de Münch), qual é a força motriz para o movimento?
4. Quais são as evidências, nesse modelo artificial, de que a translocação de solutos orgânicos se dá sob pressão e não sob tensão?
5. No modelo artificial de Münch, o transporte da solução de sacarose paralisa-se após algum tempo. Como se explica que, numa planta viva, o fluxo se mantenha sustentado, sempre no sentido da fonte para o dreno?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.6 - Exsudação de Seiva do Floema

### Introdução

A hipótese de fluxo em massa (hipótese de Münch) é a mais aceita para se explicar o transporte de assimilados nos tubos crivados do floema. O fluxo em massa movimenta assimilados solúveis das fontes para os drenos. O carregamento do floema ocorre nas folhas, em outras estruturas fotossintetizantes (como em alguns caules) e em órgãos de reprodução vegetativa, envolvendo a passagem dos assimilados, oriundos dos plastídios, em direção aos tubos crivados. O acúmulo de assimilados nos tubos crivados, principalmente sacarose, reduz seu potencial hídrico, deslocando água das células de parênquima adjacentes. Posteriormente, devido ao aumento na pressão de turgescência dos tubos crivados, os assimilados são transportados (em fluxo em massa) da fonte para o dreno, que podem ser, por exemplo, um fruto ou um tubérculo em formação, bem como regiões que necessitem de suprimentos de assimilados para se desenvolver.

A existência de pressão positiva na seiva do floema é requisito básico para a hipótese de Münch (fluxo por pressão). A manutenção da pressão positiva no floema é fundamental para o aumento da pressão de turgescência, o que possibilita o transporte dos assimilados. Danos mecânicos podem resultar na perda de pressão nos elementos do floema e, portanto, as placas crivadas próximas ao local devem ser rapidamente vedadas. Quando se secciona um caule de uma planta, ocorre a imediata exsudação da seiva floemática. No entanto, o fluxo não demora muito a cessar, devido à deposição de proteínas (proteínas-P) que obstruem as placas crivadas minimizando a perda de pressão. Cortando-se uma fatia de aproximadamente 1 mm da base do caule, o processo se renova. Pode-se repetir a operação por horas e o volume total do exsudato coletado é muitas vezes maior do que o volume do floema do caule que foi removido nos cortes sucessivos. Quando o floema sofre uma lesão muito grande, a recuperação dos vasos torna-se impossível. Nesses casos,

a vedação definitiva ocorre pela deposição de calose, um polissacarídeo sintetizado nas células do floema.

### Objetivos

Observar o fluxo de seiva floemática quando se secciona caules de aboboreira, confirmando a existência de pressão positiva nesse tecido de condução.

### Materiais

- Folhas de aboboreira com pecíolo
- Álcool etílico comercial
- Tubos de ensaio grande (1,5 x 12,5 cm)
- Lâmina de barbear

### Procedimentos

Obtenha folhas de plantas de aboboreira, conservando as mesmas em recipiente com água. Após encher tubos de ensaio com álcool, até aproximadamente a sua metade, faça um corte na base do pecíolo de uma folha e coloque-a rapidamente no tubo. Assim que a exsudação parar ou diminuir, repita o procedimento. Em seguida, observe o processo utilizando uma folha murcha da mesma espécie. A visualização do exsudado torna-se mais fácil quando os tubos de ensaio são colocados contra uma fonte de luz.

### Questionário

1. De que regiões do pecíolo saem os exsudados?
2. Por que a exsudação paralisa após alguns minutos?

3. Qual é o estado normal da seiva do floema, sob pressão ou sob tensão?  
Justifique sua resposta

4. Nas folhas murchas ainda se observa exsudação da seiva do floema. Todavia, por que a intensidade da exsudação é menor que na folha túrgida?

5. Qual a composição da seiva do floema?

6. Por que se utiliza álcool e não água destilada para visualizar a saída do exsudado?

7. De que modo os afídeos (pulgões) se alimentam das plantas e que relação tem isso com o estado da seiva do floema?

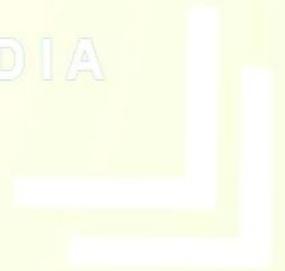
8. Os vasos laticíferos da seringueira estão sob pressão positiva ou sob pressão negativa (tensão)? Justifique.

9. Como você poderia correlacionar a saída do exsudado nas folhas de aboboreira com o modelo da teoria do fluxo em massa, por pressão, de Münch?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 5.7 - Difusão dos Gases

### Introdução

Conforme previsto pela 1ª. Lei de Fick ( $J_s = -D_s (\partial C_s / \partial x)$ ), as substâncias se difundem mais rapidamente quando o gradiente de concentração ( $\Delta C_s$ ) e/ou o coeficiente de difusão ( $D_s$ ) são elevados. Uma equação derivada da 1ª. Lei de Fick,  $T_{c_{1/2}} = (\text{distância})^2 / D$ , na qual  $D$  corresponde ao coeficiente de difusão, permite estimar a metade do tempo necessário ( $T_{c_{1/2}}$ ) para que um processo de transporte ocorra por difusão. Utilizando essa equação, é possível perceber que a difusão em meios líquidos (soluções) somente é rápida em dimensões intracelulares (distâncias curtas), enquanto é demasiadamente lenta para transporte de massas a distâncias longas. Em contraste, a difusão dos gases é normalmente um processo rápido, o que se explica pelos elevados coeficientes de difusão ( $D$ ) dessas moléculas.

A redução do  $\Psi_w$  nas folhas é decorrente da liberação de água através dos estômatos (transpiração). Esse processo se caracteriza pela perda de água no estado gasoso para a atmosfera, o que ocorre por difusão das câmaras subestomáticas para o meio externo.

### Objetivos

Evidenciar o processo de difusão de gases utilizando um ácido e uma base fortes. Correlacionar os resultados observados ao processo de transpiração.

### Materiais

- Ácido clorídrico fumegante (HCl)
- Hidróxido de amônio P.A. (NH<sub>4</sub>OH)
- Tubo em forma de "U", pipeta grande ou bureta de 50 mL

- Algodão
- Pipeta de Pasteur
- Filme de PVC

### Procedimentos

Em função da toxidez e da evaporação dos gases liberados a partir das soluções concentradas de NH<sub>4</sub>OH e HCl, esse experimento deverá ser realizado ao ar livre ou em capela de exaustão. Essas substâncias são comercializadas em frascos com dosagens altas que podem ser utilizadas diretamente no experimento. Como as soluções empregadas são concentradas, deve-se ter extremo cuidado para evitar acidentes.

Os dois gases irão se difundir em um tubo de vidro. Quando eles se encontrarem, formarão um anel branco. Utilizando-se de uma pipeta de Pasteur, pingue simultaneamente 4-5 gotas de NH<sub>4</sub>OH (aproximadamente 0,80 mL) em uma das extremidades do tubo e 4-5 gotas de HCl (aproximadamente 0,80 mL) na outra extremidade. Os dois gases produzidos (NH<sub>3</sub> e HCl) migrarão da extremidade em direção ao centro do tubo de vidro. No encontro dos gases, haverá a formação de um anel branco de cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl).

Meça a distância de migração por difusão de cada um dos gases, da extremidade da qual eles foram pingados até ao ponto de formação do anel branco (encontro dos dois gases). É importante que se faça uma marca logo no início da formação do anel, pois o mesmo irá mudar de posição devido ao gás mais leve (NH<sub>3</sub>) ser deslocado pelo mais pesado (HCl).

A taxa de difusão de um gás é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa molar desse gás. Sabendo que a massa molar do HCl é aproximadamente o dobro da massa do NH<sub>3</sub> (massas atômicas: N=14,0; Cl=35,4; H=1,0), é possível calcular a taxa de difusão desses gases. Para o cálculo, utilize a equação a seguir:

$$\frac{d_1}{d_2} = \frac{\sqrt{m_2}}{\sqrt{m_1}}$$

onde:

$d_1$ ,  $d_2$  = distância de migração de cada um dos gases (da extremidade do tubo até o anel branco pálido primeiramente formado).

$m_1$ ,  $m_2$  = massa molecular de cada um dos gases ( $\text{NH}_3$  e  $\text{HCl}$ ).

### Questionário

1. Por que a formação do anel branco de cloreto de amônio não ocorreu no meio do tubo?

2. O que aconteceu quando foi adicionado ao tubo as substâncias  $\text{NH}_4\text{OH}$  ou  $\text{HCl}$  após a formação inicial do anel de  $\text{NH}_4\text{Cl}(s)$ ? Explique.

3. Calcule a taxa de difusão relativa dos dois gases ( $\text{NH}_3$  e  $\text{HCl}$ ).

Dados: massas moleculares: 1 -  $\text{HCl}$  = 36,5 g/mol; 2 -  $\text{NH}_3$  = 17,03 g/mol.

4. Considerando que os estômatos controlam a entrada de dióxido de carbono e também a perda de água, que molécula se difunde mais facilmente através desses poros, o  $\text{CO}_2$  ou a  $\text{H}_2\text{O}$ ? Qual é a influência das diferenças na velocidade de difusão dessas moléculas sobre a eficiência do uso da água por parte das plantas?

Dados: massas moleculares: 1 -  $\text{CO}_2$  = 44 g/mol; 2 -  $\text{H}_2\text{O}$ : 18 g/mol:

## 6 - NUTRIÇÃO MINERAL

Além dos elementos gasosos obtidos da atmosfera, as plantas também necessitam absorver água e elementos minerais, provenientes do solo. Essas substâncias, necessárias às reações químicas que ocorrem nos vegetais, são extraídas do solo pelas raízes e distribuídas através da planta pelos sistemas de condução. Após absorvidos e transportados, os nutrientes podem ser utilizados na fotossíntese, na síntese de aminoácidos, vitaminas, enzimas e outras substâncias do metabolismo. O solo não tem como única função fornecer os elementos químicos necessários aos vegetais. Ele também está envolvido na sustentação das plantas e no armazenamento de água, além de propiciar um ambiente gasoso conveniente para o desenvolvimento do sistema radicular. O solo contribui com três componentes fundamentais para o crescimento das plantas: a estrutura, propiciada por seus diferentes constituintes físicos (areia, silte e argila), a água e o ar.

Os nutrientes inorgânicos utilizados pelas plantas podem ser derivados da atmosfera. Todavia, as rochas da crosta terrestre constituem a fonte principal e, pela ação do intemperismo, liberam os elementos minerais para a solução do solo. A ação do intemperismo faz com que as rochas ígneas sejam decompostas liberando componentes solúveis (nutrientes) e insolúveis que transportados pelo vento ou pela água, formam depósitos em outros lugares, originando as rochas sedimentares. As rochas metamórficas, por sua vez, se originam de outras rochas submetidas a grandes pressões e temperaturas.

Estudos realizados a partir da década de 50 resultaram no estabelecimento dos critérios de essencialidade dos elementos minerais. Para que um elemento mineral seja incluído nessa lista, ele deve atender a três critérios: 1) na ausência do elemento, a planta não completa o seu ciclo de vida; 2) o elemento não pode ser substituído por nenhum outro e; 3) o elemento deve ter efeito direto na vida da planta e não apenas

exercer o papel de, com a sua presença no meio, neutralizar efeitos físicos, químicos ou biológicos desfavoráveis para a planta.

A partir de vários estudos, treze elementos minerais provenientes do solo (excluindo os elementos provenientes da água, do oxigênio e do gás carbônico) são atualmente considerados essenciais. Esses elementos foram reunidos em duas classes: macronutrientes e micronutrientes. Essa separação considera critérios quantitativos, ou seja, os macronutrientes são necessários em maior quantidade e, por isso, são encontrados em maior quantidade nos tecidos das plantas. Por sua vez, os micronutrientes são necessários em menor quantidade e também são encontrados em menor quantidade nos tecidos das plantas. Os macronutrientes incluem seis elementos (N, P, K, Ca, S e Mg) e os micronutrientes outros sete (B, Cl, Fe, Mo, Zn, Cu, Ni).

Os sintomas de deficiência mineral nas plantas dependem de dois fatores principais: da função ou funções dos elementos minerais no metabolismo e da facilidade ou dificuldade de transporte dos elementos das folhas mais velhas para as partes mais novas da planta através do floema. Os elementos minerais são divididos em três grupos considerando a sua mobilidade no floema: a) móveis: N, P, K, Mg e Cl; b) mobilidade intermediária: Mn, Zn, Cu, Mo e S; c) imóveis: Fe, Ca e B.

O nutriente mineral deve entrar no simplasto para exercer suas funções no metabolismo vegetal. No entanto, para entrar em um ambiente encerrado por biomembranas, o nutriente deve passar por, pelo menos, uma delas, a membrana plasmática. Esta membrana oferece resistência à passagem de nutrientes minerais tanto na forma catiônica quanto na aniônica, conforme ocorrem e são absorvidos:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{ZnOH}^+$ ,  $\text{Zn}^-$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^-$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{BO}_3$ ,  $\text{HBO}_3^{2-}$  e  $\text{Cl}^-$ . A fase lipídica apolar da membrana plasmática oferece alta resistência à passagem desses cátions e ânions. Também devido à fase polar da plasmalema, cátions e ânions têm dificuldades para atravessá-la, pois eles interagem com os pólos dessa biomembrana, ficando aí adsorvidos. Os pólos da membrana plasmática e de outras biomembranas são condicionados pela presença de átomos ou

moléculas ligados aos lipídios, tais como fósforo (formando fosfolipídios), enxofre (sulfolipídios) ou, ainda, açúcares (glicolipídios). Em função disso, existem vários facilitadores de entrada dos nutrientes minerais através das biomembranas (carregadores e canais iônicos).



# FISIOLOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 6.1 - Adsorção pela Matriz do Solo

### Introdução

A capacidade de troca de cátions (CTC) é o parâmetro mais importante da fertilidade do solo, pois a maioria dos metais do solo forma íons positivos (cátions) que se ligam (adsorvem) mais facilmente às partículas de argila (matriz do solo), predominantemente carregadas com cargas negativas. Essa ligação é fundamental, pois os cátions ficam retidos (por adsorção) às partículas do solo, evitando a lixiviação. Porém, os ânions são “repelidos” pelas cargas negativas presentes nas partículas de argila (com exceção do fosfato que forma precipitados insolúveis no solo), sendo mais facilmente lixiviados e carregados até o lençol freático, o que pode causar a poluição de rios e de reservatórios de água.

A estrutura cristalina das partículas do solo é constituída, sobretudo, por átomos de oxigênio, silício, alumínio ou magnésio. Nessa estrutura cristalina, os átomos de oxigênio ficam voltados para fora e, como são mais eletronegativos, a densidade da nuvem eletrônica é maior na eletrosfera do oxigênio, formando aí, pólos negativos. A origem das cargas negativas na superfície das partículas de argila é a substituição isomórfica do  $Al^{3+}$  e do  $Si^{4+}$  (alumino-silicatos). Os cátions adsorvidos às partículas de argila são trocados por outros cátions mantidos na solução do solo ou na superfície das raízes, estruturas que também apresentam predominantemente cargas negativas em decorrência da dissociação do  $H^+$  dos ácidos carboxílicos e de compostos fenólicos das microfibrilas de celulose. Esse processo envolve troca catiônica e, portanto, a CTC reflete o nível de fertilidade do solo.

### Objetivos

Evidenciar a capacidade de adsorção de cargas dos solos, sobretudo de cátions, devido à polaridade negativa na superfície das partículas. Relacionar a capacidade de adsorção de cátions com a

nutrição mineral das plantas. Demonstrar o comportamento do solo como matriz capaz de reter os elementos minerais para as plantas.

### Materiais

- Provetas de vidro de 100 mL
- Funis de vidro ou de PVC
- Béqueres
- Bastão de vidro
- Areia (fina e branca de preferência)
- Corante carregado positivamente [azul de metileno 0,1 e 0,01% (p/v)]
- Corante apolar [eosina 0,01% (p/v)]
- Algodão

### Procedimentos

Prepare soluções aquosas dos corantes azul de metileno e eosina (300 mL de cada solução) em recipientes diferentes e nas concentrações especificadas. Essas soluções devem ser um pouco translúcidas. Coloque um pedaço de algodão no início das hastes dos funis para evitar que a areia fina escorra para fora. Encha funis de vidro ou de PVC com volumes iguais de areia fina. Suspenda cada funil com o auxílio de uma proveta. Reserve um volume de 200 mL de cada corante em dois béqueres. Em um terceiro béquer, faça uma mistura de volumes iguais (100 mL de azul de metileno 0,01% e 100 mL de eosina 0,01%) dos dois corantes. Com um bastão de vidro, abra um pequeno espaço no centro da areia contida no funil e derrame lentamente o corante reservado no béquer. Utilize um funil com areia para cada corante. Observe as cores das soluções derramadas no funil e as cores das soluções coletadas nas provetas. Observe também a cor que a matriz do solo vai assumindo conforme a solução é coletada na proveta. Adicionalmente, poderá ser testada uma solução mais concentrada de azul de metileno (0,1%).

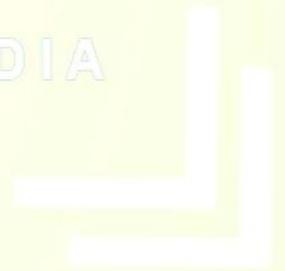
## Questionário

1. O que é adsorção?
2. Porque a CTC é considerada o parâmetro mais importante da fertilidade do solo?
3. Explique porque a eosina não foi adsorvida pela matriz do solo, sendo quase que integralmente recolhida na proveta.
4. Explique as diferenças encontradas quando foram utilizadas as duas concentrações de azul de metileno.
5. Por que as adubações nitrogenadas e as contendo enxofre devem ser parceladas?
6. Que analogia você faz entre os resultados da prática e a realização de adubações pesadas nos solos?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## 7 - CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO

As angiospermas crescem e se desenvolvem em resposta à atividade contínua de meristemas apicais que adicionam novos tecidos às partes velhas do corpo vegetal. A atividade meristemática não está, todavia, confinada aos ápices de caules e raízes, pois zonas potencialmente meristemáticas permanecem nas partes mais velhas (câmbio vascular, gemas axilares e epicórmicas, flores e frutos em desenvolvimento). Durante o seu desenvolvimento, a planta passa por uma série de etapas, incluindo germinação, crescimento vegetativo, floração, frutificação, maturação e senescência. Essa sequência ordenada de transformações ontogenéticas, basicamente qualitativas, constitui o desenvolvimento, processo sujeito a um sistema de controle que assegura integração e coordenação no tempo.

Os controles que levam à integração espacial ou temporal do crescimento e desenvolvimento da planta podem ter determinação autônoma ou mesológica, isto é, podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Desde que as condições ambientais (mesológicas) não variem apreciavelmente ao longo do organismo vegetal, a coordenação espacial é exercida, normalmente, por sistemas de controle autônomo. O ambiente pode, contudo, modificar a forma e intensidade da integração, como nos efeitos da luz e de nutrientes minerais na expressão da dominância apical. A coordenação temporal pode ser efetuada tanto por fatores autônomos quanto mesológicos. Como exemplo, temos a indução floral em plantas indiferentes e em plantas fotoperiodicamente sensíveis (controle mesológico). A temperatura, a luz (quantidade, qualidade e duração), a água, os gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e  $\text{N}_2$ ), os nutrientes minerais, os ventos e os poluentes ( $\text{O}_3$ , CFCs, etc.) são os principais controles mesológicos do desenvolvimento.

A fase vegetativa do desenvolvimento inicia-se com a embriogênese, mas continua durante toda a vida da planta até a sua senescência e morte. O crescimento consiste em mudanças quantitativas

irreversíveis que ocorrem em células, tecidos e órgãos. O crescimento compreende variações em termos de peso, tamanho e volume e apresenta dois componentes básicos: a divisão celular, que ocorre nas células meristemáticas, e o alongamento (expansão) celular, que acontece exclusivamente em células com paredes primárias. A expansão está diretamente associada ao aumento de tamanho do vacúolo e depende da pressão osmótica gerada pelo acúmulo de substâncias osmoticamente ativas em seu interior, além da capacidade de “expansão” da parede celular, que está vinculada à ação de auxinas na produção dos “fatores de afrouxamento da parede”.

No processo de diferenciação celular, diversas alterações bioquímicas, anatômicas e morfológicas contribuem para a especialização, tendo por objetivos a histogênese e a posterior organogênese. Ao contrário das alterações envolvendo o crescimento, que são irreversíveis, as mudanças relacionadas à diferenciação podem ser reversíveis. O desenvolvimento vegetal é um evento resultante do conjunto de processos de crescimento e de diferenciação celular e encontra-se sobre o controle e influência de fatores genéticos, hormonais e ambientais.

Os hormônios dos vegetais, em função de suas características simples e particulares e das diferenças em relação aos hormônios dos animais, são denominados fitormônios (ou fitorreguladores). Os fitormônios são caracterizados segundo os mesmos critérios utilizados na conceituação dos hormônios dos animais. Os fitormônios são substâncias naturais (mensageiros químicos) produzidas em concentrações reduzidas, com atuação nos locais de síntese e/ou à distância, e que apresentam amplo espectro de atividades biológicas. Os fitormônios são mensageiros químicos primários e, provavelmente, são as moléculas mais importantes e elaboradas do metabolismo. Nas plantas, a síntese dos fitormônios também se encontra sob controle endógeno (genético e metabólico) e ambiental.

Além dos fitormônios, que são naturais, as plantas também podem ter seu crescimento e desenvolvimento controlados por

substâncias sintéticas com atuação análoga às dos fitormônios. Essas moléculas são denominadas reguladores de crescimento, substâncias sintéticas (artificiais) com propriedades biológicas análogas às dos fitormônios e que também atuam em baixas concentrações, tanto nos locais onde foram aplicadas quanto à distância.

Nos tecidos vegetais, existem diversas substâncias naturais com propriedades hormonais. A maioria pertence a um dos grupos de sinalizadores específicos, identificados como “fitormônios clássicos”, devido suas atividades biológicas serem características em diferentes espécies vegetais, da sua identificação mais remota, além da sua popularização. Cinco diferentes classes de fitormônios (e de reguladores de crescimento) se destacam: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico.

O controle da concentração endógena dos fitormônios encontra-se sobre a influência de diferentes mecanismos. O equilíbrio dinâmico da concentração dos fitormônios é regulado ao nível da síntese (expressão gênica), pela compartimentação em organelas e no vacúolo (armazenamento reversível), pela ligação reversível dos fitormônios a diferentes moléculas (perda momentânea de atividade biológica; também não sofre ação enzimática catabólica enquanto é transportado e/ou armazenado) e, pela sua degradação, resultante do catabolismo irreversível, realizado por ação enzimática.



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.1 - Tropismos e Nastismos

### Introdução

Por não apresentarem estruturas de locomoção, as plantas terrestres precisam ajustar o seu corpo em resposta às alterações no ambiente. Os tropismos são movimentos de crescimento orientados, realizados em direção às fontes de estímulos ou na direção oposta. Os mecanismos que causam essas respostas são praticamente os mesmos. Normalmente, eles estão associados à distribuição desigual de auxinas nos tecidos da planta, fazendo com que o lado em que elas se acumulam em excesso ou estejam em nível reduzido cresça de forma mais lenta ou mais rápida do que o outro, promovendo, como consequência, uma resposta de crescimento orientada.

Os principais tipos de tropismos são o fototropismo e o gravitropismo. No fototropismo, os ápices da parte aérea, locais de maior produção de auxinas, são as regiões de maior sensibilidade à luz. Porém, a região de curvatura localiza-se um pouco abaixo do ápice. A luz azul, absorvida pelas fototropinas, promove o movimento das auxinas (AIA) para a face menos iluminada. O subsequente fluxo do AIA através da zona de crescimento é responsável pelo maior alongamento das células, resultando em curvatura da parte aérea em direção à fonte de luz. O gravitropismo se caracteriza como um movimento de crescimento em resposta ao vetor gravitacional, envolvendo, também, a participação de auxinas (AIA). Quando plântulas de aveia crescidas no escuro são orientadas horizontalmente sobre uma superfície plana, os coleóptilos curvam-se na direção oposta à ação da gravidade. De acordo com o modelo de Cholodny-Went, em um coleóptilo mantido na posição horizontal, a auxina é transportada lateralmente para a metade inferior da sua estrutura, levando-a a crescer mais rapidamente do que a metade superior. Efeito inverso se observa nas raízes, onde concentrações elevadas de auxinas atuam inibindo o crescimento.

Ao contrário dos tropismos, os nastismos são movimentos não orientados, embora também sejam desencadeados por estímulos ambientais. Alguns movimentos násticos das plantas ocorrem em resposta a variações no crescimento, enquanto outros envolvem alterações na turgescência. As principais respostas násticas ocasionadas por variação no crescimento são a epinastia (maior crescimento do lado superior) e a hiponastia (maior crescimento do lado inferior). Acredita-se que o principal agente causador de epinastia/hiponastia seja o etileno. As principais respostas násticas causadas por variação na turgescência são o nictinastismo e o sismonastismo. O nictinastismo se manifesta pelos movimentos de fechamento de folhas ou de ramos de plantas que apresentam ritmos circadianos regulados pela luz. As folhas ou os ramos dessas plantas se movimentam lentamente para cima e para baixo em resposta aos ritmos diários de luz e escuro. O sismonastismo é outro tipo de movimento nástico, sendo resultante de estimulação mecânica, térmica ou elétrica. Esses movimentos são característicos do comportamento da planta conhecida como “dormideira” ou “sensitiva” (*Mimosa pudica*), cujos folíolos ou, às vezes, ramificações inteiras fecham-se muito rapidamente (0,1 s) em resposta ao toque, vibração, estímulo térmico ou elétrico.

### Objetivos

Observar fenômenos de tropismos e nastismos em diferentes tipos de plantas.

### Materiais

- Planta de milho e de feijão
- Plantas de *Mimosa pudica* L. (Fabaceae)
- Papel-filtro para germinação (germiteste) ou papel toalha
- Bandeja plástica

- Piseta
- Béquero de 2 L ou frasco de vidro grande
- Saquinho plástico transparente
- Pinça

## Procedimentos

Obtenha sementes de milho e de feijão. Abra uma folha de papel-filtro para germinação no interior de uma bandeja e umedeça-a com água. Coloque as sementes dessas espécies em diferentes orientações (para cima, para baixo e lateralmente), próximas aos bordos das folhas de papel. Com outra folha de papel-filtro, cubra as sementes, umedecendo e enrolando o papel. Os rolos formados deverão ser transferidos para béquer de 2 L com cerca de 1 L de água. Após a colocação de todos os rolinhos contendo as sementes no béquer, cubra-o com um saquinho plástico transparente para manter a umidade interna. Deixe o béquer em presença de luz. Entre 2-10 dias, quando as sementes já tiverem germinado e as plântulas apresentarem folhas desenvolvidas, desenrole os rolinhos de papel e observe as características das raízes e da parte aérea das plantas de cada espécie.

As respostas fototrópicas podem ser evidenciadas através da iluminação lateral de plântulas e da sua comparação com plantas iluminadas uniformemente. Para tanto, ilumine plantas de milho ou de feijão lateralmente com uma lâmpada forte durante 2-5 dias. Alternativamente, ilumine outras plantas com uma lâmpada forte, porém mantida acima dos recipientes contendo as mesmas. Compare os resultados obtidos.

A ocorrência de resposta nictinástica pode ser obtida pela observação de plantas de feijão mantidas em copos plásticos. Observe a orientação das folhas das plantas entre 7 e 16 horas e entre 17 e 6 horas. Anote os resultados.

A ocorrência de resposta sismonástica pode ser obtida pela observação de plantas de *Mimosa pudica* mantidas em vasos. Durante o

dia, efetue toques em folíolos e em foliíolos dessa planta. Observe a velocidade de fechamento desses órgãos bem como a velocidade de reabertura dos mesmos. Nessas plantas também é possível observar o fenômeno de nictinastia.

## Questionário

1. Quais são os principais tipos de movimentos de crescimento em resposta aos estímulos externos observados em plantas?
2. O que caracteriza as respostas classificadas como “tropismos”?
3. Por meio de quais mecanismos as plantas respondem à luz?
4. Por meio de quais mecanismos as plantas respondem à ação da força da gravidade?
5. No que consistem os movimentos násticos?
6. Descreva e apresente exemplos de movimentos násticos causados por variação no crescimento.
7. Descreva e apresente exemplos de movimentos násticos causados por variação na turgescência.

## Prática 7.2 - Atividade Herbicida do 2,4-D

### Introdução

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um regulador de crescimento derivado do ácido fenoxiacético. O 2,4-D apresenta capacidade de translocação na planta e tem efeito regulador mais intenso do que o AIA (natural), provavelmente por ser sintético e, conseqüentemente, ter maior atividade na planta.

Substâncias com atividades auxínicas, mesmo em baixas concentrações, podem estimular a produção de etileno e os efeitos que aparecem na planta são devidos a esse hormônio gasoso. Na biossíntese do etileno, as auxinas aumentam a conversão do SAM (*S*-adenosil metionina) em ACC (ácido carboxílico amino ciclopropano), o que resulta em aumento na sua produção. As monocotiledôneas são menos sensíveis ao 2,4-D, possivelmente devido à ocorrência de nervuras paralelas que causam menor distribuição nas folhas e, também, provavelmente devido à menor quantidade de receptores hormonais. Em função disso, os efeitos do 2,4-D são menos intensos em monocotiledôneas do que em eudicotiledôneas. O 2,4-D é utilizado como herbicida seletivo, pois, em concentrações adequadas, é letal apenas para latifoliadas (plantas de folhas largas). Sua toxidez se manifesta por meio de vários efeitos, como epinastia das folhas, interrupção do crescimento, cloroses e necroses, levando à senescência e à queda das folhas.

Além do 2,4-D, outros herbicidas encontram-se disponíveis no mercado, como o glifosato (Roundap®), por exemplo, que dentre vários efeitos no metabolismo secundário interfere na biossíntese de lignina, comprometendo a estrutura do xilema e, conseqüentemente, o transporte de água nas plantas. Existem, ainda, outros tipos de herbicidas, como o Paraquat® que bloqueia a transferência de elétrons na fotossíntese. No entanto, ambos não apresentam seletividade. Por isso, o 2,4-D é utilizado em pós-emergência (após a germinação e

estabelecimento das plantas invasoras) como herbicida seletivo para eudicotiledôneas infestantes de campos cultivados com monocotiledôneas (milho, cana, arroz, sorgo, etc.).

Em eudicotiledôneas, o 2,4-D, mesmo em quantidades reduzidas, promove a ativação de genes inativos, alterando os tipos de RNA sintetizados, aumentando a atividade das polimerases de RNA e DNA e afetando o funcionamento de enzimas respiratórias. Além disso, o 2,4-D estimula a síntese de etileno. Em função dessas alterações metabólicas, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que estimulam a senescência das folhas e a morte das plantas. Todavia, o uso descontrolado desse herbicida pode causar intoxicações em animais e contaminação de cursos de água, prejudicando o meio ambiente.

O 2,4-D é um dos componentes do “agente laranja” utilizado na Guerra do Vietnam como desfolhante. O “agente laranja” é uma mistura de ésteres *n*-butílicos de 2,4-D e de 2,4,5-T (ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético), outra auxina sintética. Infelizmente, na síntese do 2,4,5-T não foram tomadas as devidas precauções e nem foram realizados testes adequados. Posteriormente, descobriu-se que o 2,4,5-T, durante a sua síntese, sofreu contaminação por tetracloro-dibenzodioxina (2,3,7,8-TCDD), uma dioxina tóxica e cancerígena, prejudicial aos animais e seres humanos. Atualmente, muitas áreas no Vietnam ainda encontram-se contaminadas com essa substância.

### Objetivos

Observar a ação seletiva do 2,4-D sobre plantas de monocotiledôneas e eudicotiledôneas.

### Materiais

- Solução de 2,4-D a 1000mg/L (0,1 g de 2,4-D/100 mL de água; solubilizar em 2-3 mL de etanol absoluto)

- Tween-20 (surfactante ou espalhante adesivo; pode ser substituído por detergente neutro)
- Quatro vasos contendo plantas de milho e de feijão com cerca 10 dias após germinação
- Borrifador

### Procedimentos

Obtenha dois vasos, cada um com uma planta de milho e outra de feijão com cerca de 20 cm cada. Com um borrifador de jardim, pulverize as plantas de um dos vasos com solução de 2,4-D, contendo 2 gotas de Tween-20, tomando cuidado para não contaminar o ambiente de trabalho. Deixe secar. Transfira os vasos para um local iluminado e mantenha irrigação adequada. Repita o mesmo procedimento em outras plantas utilizando apenas água contendo Tween-20.

Durante duas semanas observe as plantas diariamente anotando alterações visíveis na coloração das folhas, presença ou ausência de epinastia (tombamentos), senescência e morte das plantas.

### Questionário

1. Apresentem, em ordem de aparecimento, três sintomas da toxidez por 2,4-D nas plantas utilizadas no experimento.
2. Qual é a fórmula estrutural do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)?
3. Quais são as possíveis explicações para os efeitos seletivos do 2,4-D?
4. Por que o 2,4-D causa epinastia em muitas eudicotiledôneas?
5. Quais são os possíveis modos de ação do 2,4-D em nível celular?
6. Como o 2,4-D pode ter ação estimulante em vez de ação herbicida?

7. O 2,4-D poderia ser utilizado para combater uma infestação de arroz vermelho, uma monocotiledônea contaminante, em áreas de plantio de arroz para sementes?

8. As monocotiledôneas são resistentes ao 2,4-D?

9. Qual era o objetivo da utilização do 2,4-D durante a guerra do Vietnam? Quais foram as consequências dessa utilização para animais, seres humanos e para o ambiente?

## Prática 7.3 - Efeitos do 2,4-D no Alongamento de Raízes

### Introdução

O alongamento celular associado às auxinas é explicado pela “teoria do crescimento ácido”. Logo após a administração de diferentes auxinas, uma forte acidificação da parede é observada devido ao aumento do bombeamento de prótons ( $H^+$ ) em resposta ao estímulo à atividade das  $H^+$ -ATPases. A acidificação da parede é responsável pela produção dos “fatores de afrouxamento da parede”, enzimas como as pectinases, hidrolases, celulases, hemicelulases e expansinas, que atuam no aumento da extensibilidade da parede, permitindo o alongamento celular.

Todavia, as auxinas em excesso causam aumento na produção do etileno, principalmente pelo estímulo à conversão do SAM em ACC e do ACC em etileno. O etileno promove o rearranjo dos microtúbulos, causando alterações na orientação dessas estruturas (aproximadamente  $90^\circ$ ), tendo como consequência o aumento em espessura das paredes celulares devido ao alongamento desordenado das microfibrilas de celulose.

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um regulador de crescimento sintético que possui efeito análogo ao das auxinas naturais (AIA). O AIA é produzido nas folhas e em ápices caulinares e o seu transporte basípeto (ápice  $\rightarrow$  raízes) está relacionado à formação de raízes adventícias em estacas. Entretanto, as raízes são cerca de 2.000 vezes mais sensíveis às auxinas do que os caules. Portanto, quando ocorre um aumento supra-ótimo na concentração de auxinas, proporcionalmente há um aumento na produção de etileno. Assim, a parede celular aumenta em espessura tornando-se mais rígida, o que reduz o alongamento celular. É possível, portanto, que a inibição do alongamento das raízes por auxinas, em concentrações supra-ótimas, seja resultante do aumento na produção de etileno pelo tecido radicular.

### Objetivos

Avaliar os efeitos de concentrações crescentes do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre o alongamento das raízes e de partes aéreas das plantas.

### Materiais

- Placas de Petri grandes (15 cm de diâmetro)
- Solução de 2,4-D a  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$
- Pipetas de 10 mL
- Sementes de feijão (eudicotiledônea) e de milho (monocotiledônea)

### Procedimentos

A partir de uma solução-estoque de 2,4-D a  $1.000 \text{ mg.L}^{-1}$ , prepare as seguintes soluções: **A** - Água (controle), **B** -  $10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, **C** -  $10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, **D** -  $10^{-1} \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, **E** -  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e **F** -  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D.

Forre o fundo das placas de Petri com um disco de papel-filtro. Separe dois grupos, um para sementes de milho e outro para sementes de feijão, contendo 6 placas de Petri cada. Faça a marcação nas placas (tampas e bases) com caneta de retroprojektor, identificando os tratamentos (A, B, C, D, E e F). Em cada placa coloque dez sementes de milho ou dez sementes de feijão. Adicione, em cada uma, 20 ml da solução correspondente a cada tratamento.

Coloque o conjunto de placas dos diferentes tratamentos em local escuro. Avalie o desenvolvimento das raízes e da parte aérea das plantas ao final da primeira e da segunda semana.

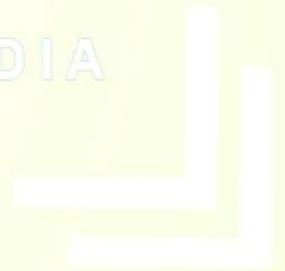
## Questionário

1. Por que pode ser vantajoso utilizar soluções de 2,4-D em meio tamponado (tampão fosfato, 10 mM, pH 6,0) para a realização dessa aula?
2. O que é possível concluir a respeito dos efeitos do 2,4-D sobre o alongamento das raízes?
3. Por que altas concentrações de 2,4-D provocam o engrossamento das raízes?
4. Pelas suas observações, raízes e caules apresentam a mesma resposta à aplicação exógena de 2,4-D? Como você explica as diferenças encontradas?
5. Altas concentrações de 2,4-D podem ser consideradas inibidoras da germinação. Por quê?
6. Por que a aplicação de 2,4-D em solos com sementes em germinação geralmente acarreta a morte de todas as plântulas, sejam essas monocotiledôneas ou eudicotiledôneas?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.4 - Indução de Raízes Adventícias em Estacas

### Introdução

Todas as raízes formadas em regiões distintas das raízes de origem embrionária (radícula), partindo de caules, folhas ou até mesmo de outras raízes são denominadas “adventícias”. Elas são naturalmente observadas em plantas de milho, sendo formadas próximas ao colo das plantas, e, também, em algumas espécies arbóreas, como em *Ficus bengalensis*. Apesar de terem origem em regiões específicas do caule (periciclo e outras porções), as raízes adventícias possuem funções e características análogas às raízes de origem embrionária.

As auxinas estimulam o enraizamento e, por isso, são utilizadas na propagação vegetativa de espécies de interesse comercial e também de espécies não domesticadas. O sucesso desse processo depende de uma série de fatores que podem interferir na rizogênese das estacas: idade da estaca (juvenil ou madura), quantidade de reservas acumuladas, hábito (arbórea, herbácea ou arbustiva), taxa de lignificação, presença ou ausência de folhas, época do ano (decídua, frutificação, florescimento), porção da planta, etc. Algumas espécies apresentam facilidade no enraizamento adventício, dispensando a aplicação de auxinas. Em contraste, outras espécies apresentam dificuldade para enraizar.

Na produção de mudas de interesse agrônomo por estaquia, geralmente utilizam-se auxinas para obter maiores taxas de sucesso no enraizamento. As auxinas mais empregadas nesses processos são o ácido indol-butírico (AIB) e o ácido naftaleno-acético (ANA), ambas sintéticas e, por isso, com a vantagem de serem mais estáveis na planta. As auxinas estimulam a produção de primórdios radiculares e, também, quando em baixas concentrações, promovem o alongamento celular. No entanto, em altas concentrações, devido ao estímulo à síntese de etileno, inibem o alongamento radicular, o que geralmente resulta em morte das estacas devido ao estresse hídrico.

A aplicação de auxinas em estacas faz-se de três principais maneiras: a) no método da imersão lenta, as estacas são deixadas durante longo tempo (geralmente 24 horas) com suas bases numa solução aquosa diluída de uma auxina (20-200 mg.L<sup>-1</sup>); b) no método da imersão rápida, as bases das estacas são imersas brevemente numa solução mais concentrada (1500-2000 mg.L<sup>-1</sup>) de auxina em álcool 50% (v/v) e; c) no método do pó, as bases das estacas são umedecidas e introduzidas num pó inerte, comumente talco, contendo auxina na concentração de 1% (p/p). Após tratamentos com auxinas, as estacas devem ser mantidas em locais sombreados, tomando-se cuidados com a manutenção da temperatura e umidade e com o controle fitossanitário.

As plantas produzidas a partir de estacas são clones e, por isso, são idênticas geneticamente, o que traz inúmeras vantagens, mas, também, desvantagens, pois os indivíduos formados apresentam as mesmas sensibilidades a fatores edafoclimáticos prejudiciais e a problemas fitossanitários. As grandes empresas de reflorestamento em todo o mundo têm no enraizamento de estacas (enraizamento adventício) a base de seus programas de produção de mudas, geralmente utilizando o método da imersão rápida, principalmente para culturas de eucalipto e pinheiro.

### Objetivos

Verificar os efeitos de uma auxina na formação de primórdios radiculares em estacas e no crescimento subsequente das raízes.

### Materiais

- Soluções aquosas de AIB a 0, 10, 20, 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup>. Solução estoque com 0,0500 g / 500 mL; solubilizar em 2-3 mL de etanol absoluto)
- Estacas com folhas e estacas sem folhas de erva cidreira (*Lippia alba* L., Verbenaceae) com cerca de 25 cm de comprimento, de

preferência juvenil e sem florescimento ou frutificação e/ou de outra espécie de fácil enraizamento, como tapete (*Coleus* sp., Lamiaceae).

- Copos plásticos de 250-300 mL

### Procedimentos

O método utilizado na prática será o da imersão lenta. Obtenha cinco copos plásticos e adicione 50 mL das soluções de AIB nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup>. Coloque 10 estacas com folhas e 10 estacas sem folhas em cada um dos tratamentos. As estacas com e sem folhas terão as suas bases submersas na solução correspondente até aproximadamente a metade do tamanho do copo.

Deixe as estacas em contato com cada solução de AIB por 24 horas e, após esse período, substitua as soluções por água de torneira, sempre mantendo os copos à temperatura ambiente e sob luz difusa.

Após 1-2 semanas, observe as plantas levando-se em conta o número de primórdios radiculares formados por tratamento. Verifique, comparativamente, o comprimento das raízes. Se o intervalo de 2 semanas for insuficiente, aguarde mais tempo.

### Questionário

1. O que são raízes adventícias? Qual é a origem anatômica das raízes adventícias em estacas?
2. Em quais tratamentos ocorreu maior enraizamento das estacas? Houve diferenças entre os tratamentos quanto ao tamanho das raízes?
3. Porque as estacas de determinadas espécies somente enraizam se estiverem enfolhadas, enquanto estacas de outras espécies enraizam mesmo sem folhas?

4. Explique os possíveis modos de ação de auxinas sobre o enraizamento de estacas.

5. Porque não se empregam soluções de auxinas de concentração elevada no enraizamento de estacas?

6. Poderiam outras classes de hormônios, que não as auxinas, estimularem o enraizamento de estacas?

7. Quais espécies de interesse econômico têm a sua propagação baseada na reprodução assexuada?

8. Quais são as vantagens e as desvantagens da propagação assexuada?

## Prática 7.5 - Polaridade em Plantas

### Introdução

Os fenômenos de regeneração em plantas fornecem evidências básicas da polaridade. Estacas de plantas formam raízes nos terminais basais e gemas nas extremidades apicais independente do tamanho ou posição em que a estaca for colocada. A orientação ápice → base de uma planta surge na embriogênese, logo na primeira divisão do zigoto. Essa polaridade na formação de raízes (basais) e de gemas caulinares (apicais) é mantida mesmo quando estacas são submetidas a movimentos que alteram a sua orientação morfológica.

Em estacas caulinares, as auxinas estimulam a formação de primórdios radiculares, originando raízes adventícias nas suas bases morfológicas. A manutenção dessa orientação ou polaridade é controlada pelo transporte de auxinas no sentido ápice → base morfológica. Esse transporte envolve gasto de energia e é direcionado por proteínas de membranas denominadas “proteínas carreadoras de AIA<sup>-</sup>” (proteínas PIN) que se localizam sempre nas porções basais das células de parênquima dos tecidos de condução, por onde acontece o transporte polarizado do AIA.

O AIA, produzido nas folhas e meristemas, quando no citoplasma das células, encontra-se predominantemente na forma aniônica (AIA<sup>-</sup>) devido ao pH próximo a 7,0 observado nesse ambiente. Esse pH é mantido graças à atividade das H<sup>+</sup>-ATPases que bombeiam prótons (H<sup>+</sup>) ativamente para o meio extracelular. Inicialmente, o AIA<sup>-</sup> se concentra no meio intracelular, até sofrer difusão para o apoplasto através das proteínas PIN. Nesse ambiente, devido à grande quantidade de H<sup>+</sup>, o pH é ácido (próximo a 5) e, assim, o AIA<sup>-</sup> é rapidamente convertido na forma molecular (AIAH) sem carga e capaz de entrar passivamente na célula adjacente. Esse processo se repete continuamente até a base morfológica das estacas ou mesmo nos caules intactos, onde o fluxo de AIA para as raízes também ocorre.

### Objetivos

Observar o fenômeno da polaridade pela emissão de raízes adventícias e de brotações em estacas de plantas.

### Materiais

- Estacas de erva cidreira (*Lippia alba* L., Verbenaceae) com cerca de 25 cm de comprimento, de preferência juvenil e sem florescimento ou frutificação e/ou de outra espécie de fácil enraizamento, como o tapete (*Coleus* sp., Lamiaceae)
- Copos descartáveis

### Procedimentos

Obtenha estacas sem folhas da espécie disponível com cerca de 25 cm. Para facilitar a identificação, corte as bases em ângulo reto e os ápices morfológicos inclinados. Pegue dez estacas e coloque-as com ápice morfológico voltado para cima, ou seja, a base morfológica deverá estar submersa em água até a sua metade. Outras dez estacas serão colocadas em outro copo contendo água, mas com a polaridade invertida, ou seja, mantendo o ápice para baixo e a base morfológica para cima.

Monitore diariamente a quantidade de água no copo, fazendo a troca a cada dois ou três dias. Observe os resultados durante 1-2 semanas. Se o intervalo de 2 semanas for insuficiente, aguarde mais tempo.

### Questionário

1. Somente os caules apresentam o fenômeno da polaridade? Caso sua resposta seja negativa, exemplifique.

2. Como os tecidos vegetais percebem a gravidade e apresentam respostas geotrópicas que refletem a sua polaridade?

3. Por que, mesmo quando as estacas são colocadas invertidas, não ocorre mudança na polaridade?

4. Como se explica o desenvolvimento das gemas no ápice morfológico das estacas?

5. Qual é o provável papel das auxinas no fenômeno da polaridade?



# FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.6 - Dominância Apical

### Introdução

Na maioria das espécies vegetais, a gema apical inibe o desenvolvimento das gemas laterais. A remoção da gema apical provoca a brotação das gemas laterais (basais), o que evidencia esse tipo de inibição correlativa, observada, por exemplo, quando se efetuam podas ou a decapitação de uma planta. Adicionando-se uma auxina à superfície decapitada de uma planta, cuja gema apical foi removida, a dominância é mantida, o que leva à conclusão de que as auxinas estão envolvidas no controle desse fenômeno.

As folhas novas da gema apical produzem grandes quantidades de auxinas, sinal correlativo da dominância apical. Como uma baixa relação auxina/citocinina na gema lateral promove o seu desenvolvimento, pode-se supor que o suprimento de citocininas para as gemas laterais seja regulado pelas auxinas da gema apical (altas concentrações de auxina na gema apical orientariam o transporte de citocininas ou de seus precursores para si). As auxinas da gema apical também poderiam afetar a síntese de citocininas ou a sua utilização nas gemas laterais. Outros reguladores de crescimento, como giberelinas e ácido abscísico, também parecem estar envolvidos no fenômeno da dominância apical e na inibição das gemas laterais.

### Objetivos

Observar os efeitos da remoção da gema apical no crescimento das gemas laterais, assim como os efeitos da aplicação do ácido indolacético (AIA) no controle da dominância apical.

### Materiais

- Plantas de feijão com a primeira folha trifoliada completamente expandida
- Lanolina pura
- Pasta de lanolina contendo AIA 0, 1 % (p/v) - pesar 0,0010 g de AIA; em solubilizar em 2-3 mL de etanol absoluto; adicionar 1 g de lanolina pura e aquecer; depois esperar resfriar)
- Bastão de vidro

### Procedimentos

Obtenha três vasos plantados com feijoeiros apresentando a primeira folha trifoliada completamente expandida. Uma planta servirá de controle, enquanto as outras duas terão a base da primeira folha decapitada. Aplique, com um bastão de vidro, lanolina pura na superfície decapitada de uma das plantas. Proceda da mesma forma com a outra, aplicando a pasta de lanolina contendo o AIA. Nas aulas práticas subsequentes, renove a pasta de lanolina nas plantas dos respectivos tratamentos.

Durante três semanas observe o desenvolvimento das plantas decapitadas e da planta intacta.

### Questionário

1. Como você explica o desenvolvimento das gemas laterais após a retirada da gema apical?
2. De que modo estaria agindo a auxina aplicada na parte decapitada do caule para inibir o crescimento das gemas laterais?
3. Relate alguns tratamentos que poderiam induzir o crescimento das gemas laterais.

4. Como se explica o aumento do diâmetro do caule no nível das superfícies seccionadas e tratadas com pasta de lanolina+AIA?

5. Somente as auxinas estão envolvidas na dominância apical ou outros fitormônios também podem estar envolvidos nesse fenômeno? Explique.

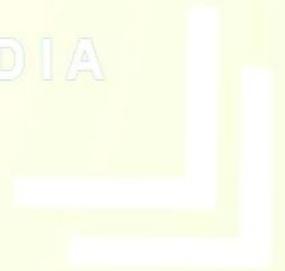
6. Pelo fato de o AIA poder substituir a gema terminal na manutenção da dominância apical, você poderia dizer que esse hormônio "inibe" o crescimento das gemas laterais? Que outra explicação mais plausível você poderia dar?

7. Um técnico obteve duas amostras, sendo uma de citocinina (BAP) e outra de ácido indolacético (AIA), mas esqueceu-se de rotulá-las, não sabendo, portanto, identificá-las. Como você poderia ajudar esse técnico na identificação, utilizando os estudos da dominância apical como teste?



# FISIOLOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.7 - Efeitos Gerais do Etileno

### Introdução

O etileno é um hidrocarbonato simples ( $H_2C = CH_2$ ) produzido naturalmente na maioria dos tecidos em resposta aos estresses ambientais, especialmente em órgãos senescentes ou em amadurecimento. Na maioria das espécies vegetais, o etileno tem efeito inibitório sobre a expansão celular. Nos frutos climatéricos, a síntese de etileno aumenta após a colheita, o que estimula o amadurecimento. Esse efeito possui importância agrícola e é utilizado, por exemplo, na promoção do amadurecimento de diversos tipos de frutos que podem ser colhidos verdes e estocados na ausência de etileno até pouco antes de serem comercializados.

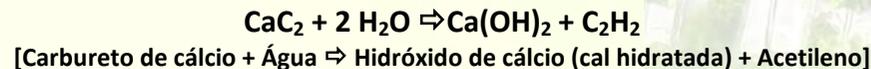
O etileno promove abscisão (queda) de folhas, flores e frutos em diversas espécies vegetais. Nas folhas, o etileno presumidamente dispara a síntese das enzimas que causam a dissolução das paredes celulares localizadas nas zonas ou camadas de abscisão. Em vários sistemas, a abscisão é controlada pela interação etileno/auxina. Enquanto o etileno dispara a abscisão, a auxina parece reduzir a sensibilidade das células da zona de abscisão ao etileno e assim previne a queda. Todavia, esse efeito somente se manifesta antes do processo de senescência ter iniciado, pois as auxinas também estimulam a produção do etileno. As citocininas também têm efeito marcante na prevenção à senescência. Elas são produzidas nas raízes e transportadas para a parte aérea através do xilema.

O carbureto de cálcio ( $CaC_2$ ) é um composto químico produzido industrialmente em fornos de arco elétrico carregados com uma mistura de cal ( $CaO$ ) e carvão ( $3C$ ), a aproximadamente  $2.000\text{ }^\circ C$ :



O carbureto é utilizado em oficinas mecânicas para a produção de acetileno ( $HC \equiv CH$ ), utilizado em soldas e para cortar materiais metálicos. O carbureto de cálcio, quando em contato com a água, libera acetileno,

composto químico análogo e que produz efeitos similares ao do etileno ( $H_2C = CH_2$ ) em plantas e em órgãos vegetais. A produção do acetileno a partir do carbureto é mostrada na reação a seguir:



### Objetivos

Observar os efeitos do etileno e do acetileno em monocotiledôneas, em eudicotiledôneas e em ramos cortados.

### Materiais

- Uma banana
- Uma laranja
- Pedras de carbureto de cálcio
- Plantas de milho e de feijão em copos descartáveis (mantenha-os bem irrigados até antes da montagem da prática)
- Ramos destacados de flamboyant (*Delonix regia* (Bojer) Raf., Fabaceae)
- Três campânulas de vidro ou recipientes que mantenham um microclima úmido, luminosidade e temperatura adequadas
- Béqueres de 100 mL
- Massa para modelar
- Placa de Petri pequena (somente a base)

### Procedimentos

Obtenha três campânulas de vidro. Na primeira, coloque um copinho contendo uma planta de milho e uma de feijão, um ramo destacado de flamboyant (com a base em um béquer com água) e uma

laranja (apoiada em um suporte). Na segunda campânula, coloque outras plantas de milho e de feijão, outro ramo destacado de flamboyant (com a base em um béquer com água) e uma banana (também apoiada em um suporte). Na terceira campânula, coloque novamente outras plantas de milho e de feijão, outro ramo destacado de flamboyant (com a base em um béquer com água) e uma placa de Petri com água na qual será colocada uma pequena pedra de carbureto de cálcio. As bordas das 3 campânulas deverão ser lacradas com massa de modelar imediatamente após a inserção dos materiais no interior das mesmas. Mantenha as três campânulas sob luz difusa ou em ambiente sombreado.

Acompanhe diariamente, durante 1-3 semanas, o aparecimento de sintomas específicos e as diferenças observadas em cada uma das três campânulas.

### Questionário

1. Como podemos classificar os frutos quanto ao amadurecimento?
2. Apresente exemplos de frutos climatéricos e de frutos não climatéricos.
3. Como o etileno ou moléculas geradoras desse gás são utilizados na agricultura comercial?
4. Porque as bordas das campânulas devem ser lacradas com a massa de modelar?
5. Explique porque pode haver o aparecimento de raízes laterais (adventícias) nas campânulas que continham a banana e o carbureto.
6. Como se explica que laranjas, reconhecidamente frutos não climatéricos, podem estimular a maturação de bananas?



FISILOGIA

VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.8 - Efeitos do GA<sub>3</sub> e do Paclobutrazol sobre o Crescimento das Plantas

### Introdução

As giberelinas (GAs) são fitormônios envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal. A descoberta das GAs ocorreu no final da década de 1940, por Eiichi Kurosawa, um fitopatologista japonês que identificou a presença do fungo *Gibberella fujikuroi* em plantas de arroz que sofriam acamamento (tombamento). Esse fungo libera exsudatos constituídos por GAs, responsáveis pelo crescimento excessivo dos internódios.

A primeira giberelina natural identificada em plantas foi a giberelina A<sub>1</sub> (GA<sub>1</sub>). Atualmente, mais de 120 giberelinas sintéticas são conhecidas, identificadas por um número (n) - GA<sub>n</sub>. A giberelina mais conhecida é o GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), utilizada principalmente em estudos de germinação de sementes e alongamento de plantas intactas.

Nas plantas, as GAs são sintetizadas na via dos terpenóides. As GAs são diterpenos tetracíclicos compostos por unidades básicas de isopreno. As GAs estão especificamente relacionadas à definição da altura (porte) das plantas. Elas promovem o alongamento em plantas intactas normais e, principalmente, em plantas anãs. As GAs apresentam diversas aplicações práticas na agricultura e biologia, com destaque para a produção de frutos partenocárpicos (uva), aumento da produção em cana-de-açúcar (aumento no tamanho dos internódios), florescimento precoce (redução da juvenildade) em coníferas, aumento no rendimento do processo de fabricação de cervejas (produção do malte) e germinação de sementes em espécies selvagens (quebra de dormência).

Os “retardantes de crescimento” são compostos químicos que reduzem a divisão e o alongamento celular em tecidos de brotos e regulam as plantas superiores fisiologicamente, sem afetar o seu desenvolvimento. Esses compostos inibem a síntese dos terpenóides e,

consequentemente, das GAs. Os retardantes de crescimento têm sido utilizados para amenizar o crescimento das plantas (altura), reduzindo, assim, a frequência de podas e problemas com redes elétricas. Eles também são utilizados para reduzir o acamamento das plantas e para induzir a floração em algumas espécies. Os principais compostos utilizados como retardantes de crescimento são o Cicocel (CCC), o Amo-1618 e, principalmente, o Paclobutrazol (Bonzi).

### Objetivos

Evidenciar os efeitos do GA<sub>3</sub> e do paclobutrazol sobre o crescimento das plantas.

### Materiais

- Plantas de milho e de feijão com 10 dias
- Solução de ácido giberélico (GA<sub>3</sub> a 300 µM)
- Solução diluída de paclobutrazol (5 µM); Fazer 1 g / 100 mL; o PBZ possui baixa solubilidade)
- Borrifador ou pulverizador de plantas
- Tween-20 (surfactante; pode ser substituído por detergente neutro)

### Procedimentos

Obtenha plantas de milho e de feijão em copinhos plásticos. Dez dias após a germinação, pulverize, até umedecer as folhas, as plantas de cada espécie com um borrifador contendo solução de GA<sub>3</sub> ou de paclobutrazol. A essas soluções, adicione 2 gotas/100 mL de um surfactante (Tween-20) para facilitar o espalhamento e a adesão das gotas. Repita a aplicação durante 7 dias. Acompanhe o crescimento das plantas no intervalo de 15 a 30 dias considerando os tamanhos de cada

uma das plantas, além de outras características morfológicas. Compare os resultados com plantas-controle não submetidas aos tratamentos.

### Questionário

1. Como ocorreu a descoberta das giberelinas?
2. Quais são as principais funções das giberelinas no crescimento e desenvolvimento vegetal?
3. Onde são produzidas e como ocorre o transporte das GAs?
4. Quais são os retardantes de crescimento mais utilizados na agricultura?
6. O que é paclobutrazol e qual sua relação com as giberelinas?
5. Quais são as principais aplicações dos retardantes de crescimento na agricultura e na arborização urbana?



FISILOGIA  
VEGETAL  
UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



## Prática 7.9 - Efeitos da Chuva Ácida em Plantas

### Introdução

A chuva ácida é uma das principais consequências da poluição atmosférica. Normalmente, a água da chuva já é ácida, com pH próximo a 5,5 devido à formação de ácido carbônico pela reação do  $\text{CO}_2$  com a água. Entretanto, a queima de combustíveis fósseis (carvão mineral e petróleo) libera grandes volumes de óxidos de enxofre e de nitrogênio. Na atmosfera, essas substâncias sofrem oxidação e se convertem em ácido sulfúrico e ácido nítrico. Estes ácidos se dissolvem em água e estão presentes nas chuvas que se precipitam sobre as grandes cidades e, com frequência, em pontos distantes dos locais onde eles foram formados. A chuva ácida causa o amarelecimento das folhas e/ou diminuição da folhagem.

A partir do início da revolução industrial, a queima de carvão e, mais recentemente, de combustíveis fósseis, provocou um aumento acentuado da concentração de gases no ar das grandes cidades. Essa névoa gasosa cinzenta misturada ao vapor de água é conhecida como *smog* (neblina) industrial, comum em cidades densamente povoadas e industrializadas. Mais recentemente, tem-se falado em *smog* fotoquímico devido à participação da luz do sol no fornecimento de energia para a transformação de certas substâncias em outras que se acumulam no ar das cidades. É o que ocorre, por exemplo, com a liberação de compostos orgânicos voláteis e gases como o  $\text{NO}_2$  que, sob a ação da energia luminosa, converte-se em outras substâncias, entre elas o ozônio ( $\text{O}_3$ ), conduzindo à formação do *smog* que é prejudicial às plantas e aos animais.

### Objetivos

Demonstrar que a chuva ácida causa danos às plantas. Demonstrar que as plantas podem ser utilizadas como bioindicadores da poluição atmosférica.

### Materiais

- Plantas envasadas de milho e de feijão
- Pulverizador de jardim
- Erlenmeyer ou outro recipiente de vidro
- pHmetro ou papel indicador de pH
- $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3$  concentrados (0,5 mL de cada ácido por litro)

### Procedimentos

Obtenha, em copinhos plásticos, plantas de milho e de feijão com 15 dias após germinação. Em um erlenmeyer contendo aproximadamente 600 mL de água destilada, adicione, na mesma proporção, gotas de  $\text{HCl}$  e de  $\text{HNO}_3$  concentrados, até que o pH da solução fique entre 2,0 e 3,0. Para aumentar o pH da solução, utilize água destilada. Após obtenção da solução de “chuva ácida”, pulverize as plantas durante 5 dias seguidos, umedecendo bem as folhas. Após o período de aplicação da chuva-ácida, não pulverize mais as plantas com essa solução. Pulverize outro grupo de plantas apenas com água destilada (controle). Durante 1-3 semanas observe os sintomas que aparecem nas folhas velhas e nas folhas novas das plantas. Compare os resultados com as plantas do controle.

### Questionário

1. O que são e como se formam as chuvas ácidas?

2. Quais são os efeitos da chuva ácida nas plantas e nos ambientes?
3. Apresente alguns possíveis prejuízos para o homem e para o meio ambiente da ocorrência das chuvas ácidas.
4. Por que as plantas podem ser utilizadas como bioindicadores de poluição, em especial da ocorrência de chuvas ácidas?
5. No que consiste a técnica da fitorremediação? Como a fitorremediação pode ser utilizada para minimizar os efeitos danosos das chuvas ácidas?

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Felippe, G.M. *et al.* (1985) *Fisiologia do desenvolvimento vegetal*, 2ª. Ed., Editora Unicamp.
- Ferri, M.G. *et al.* (1987) *Botânica: Fisiologia - curso experimental*, 2ª. Ed., Editora Nobel.
- Maestri, M. *et al.* (1995) *Fisiologia Vegetal - Exercícios Práticos*. Caderno Didático n. 20. Editora UFV.
- Oliveira, L.E.M. & Gomide, M.B. (1986) *Fisiologia Vegetal - Aulas Práticas*. Departamento de Biologia, ESAL.
- Prado, C.H.B.A. & Casali, C. A. (2006) *Fisiologia vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. 1ª. Ed., Editora Manole.
- Raven, P.H. *et al.* (2007) *Biologia vegetal*, 7ª. Ed., Editora Guanabara Koogan.
- Ross, C.W. (1974) *Plant Physiology Laboratory Manual*, Wadsworth Publishing Company.
- Sampaio, E. (1998) *Fisiologia vegetal: teoria e experimentos*, 1ª. Ed., Editora UEPG.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2003) *Fisiologia vegetal*, 3ª. Ed., Editora Artmed.