

473

W

O EFEITO DOS ÍONS ANTAGÔNICOS  $K^+$  E  $Ca^{++}$  E DO IAA SOBRE AS MEMBRANAS DA CÉLULA DE NITELLA CERNUA BRAUN.

Por

Antônia Lélia Guadagnuci Piccolo.

Tese

apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Universidade de Campinas.

Rio Claro

1968.

Aos meus Pais

com gratidão.

ÍNDICE.

- I. Introdução.
- II. Material e métodos.
- A. O efeito sôbre a membrana inerte da célula.
- III. O efeito do EDTA sôbre a resistência mecânica da membrana externa da célula.
- B. O efeito sôbre as membranas citoplasmáticas.
- IV. A transpiração de células isoladas.
  - 1. Efeito dos íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$ .
  - 2. Efeito do IAA.
- V. A medição direta da saída ou entrada de água.
  - 1. Efeito do  $Ca^{++}$  e  $K^+$  e do EDTA sôbre o fluxo - de água.
  - 2. Efeito do IAA sôbre o fluxo de água.
- VI. Resumo geral.
- VII. Bibliografia.
- VIII. Agradecimentos.

ERRATA.

PÁGINA	DEBIA	ONDE SE LÊ	DEBIA-SE
2	37	duas monomoleculares	duas camadas monomoleculares
5	30	superfíciei	superfície
18	12	torna-se	torna-a
22	13	plasmólise	plasmoptise
23	14	Ca reduz, K	Ca reduz e K
26	10	$\bar{X}$ e $\bar{X}_2$	$\bar{X}_1$ e $\bar{X}_2$
27	12	hajá	há já
40	1	True Bartlett	True e Bartlett
41	9	nucleótídeos	nucleotídeos
43	4	células contrôle	célula contrôle
47	25	tratar	tentar
70	10	coleopti	coleoptila
70	37	membranas	membranas
81	2	média 60 a	média entre 60 a
81	10	Danielle	Danielli
88	40	indole acético	B-indol-acético
91	2	iodocetato	iodoacetato
95	39	effect	effect
98	17	Eilbrun	Heilbrunn
99	45	<u>Chara baunii</u>	<u>Chara braunii</u>

FIGURA	ONDE SE LÊ
11	-----CaCl <sub>2</sub> -----KCl
19	de células
	-----CaCl <sub>2</sub> -----F01
	de células

## I. INTRODUÇÃO.

O presente trabalho têm como tema central o estudo do efeito antagônico dos íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$  e do IAA, sobre a permeabilidade para a água de uma célula isolada de Nitella cernua Braun. Entretanto, já nas experiências preliminares foi notado um efeito sobre a membrana inerte da célula, por si só, independente, mas cuja explicação reside no efeito antagônico desses mesmos íons. Assim, apesar de se ter dado maior ênfase aos problemas de permeabilidade das membranas citoplasmáticas, um dos capítulos apresenta o estudo da membrana inerte da célula.

Sabemos que a célula vegetal possui além da membrana inerte, duas membranas citoplasmáticas, o plasmalema e o tonoplasto, que regulam a permeabilidade. O plasmalema é a camada exterior do citoplasma e o tonoplasto é a camada interior, limitando o vacúolo central. O plasmalema e permeabilidade seletiva estão intimamente ligadas, pois a permeabilidade celular é determinada pela composição química e características físicas dessa membrana. A passagem de substância através das membranas desempenha um papel importante, capacitando a célula a manter uma composição química aproximadamente uniforme, num ambiente químico amplamente variável. A característica fundamental de tal mecanismo regulatório torna-se óbvio, quando consideramos que a célula pode viver só se certos materiais movem livremente, entrando e saindo da célula, enquanto que outros são retidos ou até concentrados no seu interior. Diferentes tipos de estudo têm tornado claro, que a habilidade das células para controlar estas condições é devido, ao menos em parte, à presença da membrana superficial citoplasmática; mas, as propriedades físicas e químicas dessas membranas, tão bem como os mecanismos controlando a passagem das substâncias através dela, não são ainda bem compreendidos.

O conhecimento sobre a estrutura da membrana plasmática foi baseado, durante muito tempo, em trabalhos experimentais, relacionados com a porosidade, composição química, força superficial, propriedades elétricas, estrutura submicroscópica, etc. Como muito fecunda revelou-se a teoria de Danielli (1943), que é a mais aceita até hoje. Segundo essa teoria, a membrana plasmática é formada por duas monomoleculares de fosfolipídeos, polares, possuindo um polo hidrofóbico e outro hidrofílico. O polo hidrofóbico consiste de uma cadeia longa de átomos de C e H, ligado ao polo hidrofílico; esse último possui, uma estrutura um pouco mais

complicada contendo átomos de C, H, O, N e P. Mais tarde Danielli (1952), admitiu a existência de poros na membrana, o que poder ser devido a invaginação da própria membrana.

Com o advento dos resultados da microscopia eletrônica imaginou Robertson (1959) o conceito da "unit membrane", que é uma modificação e aplicação da teoria de Danielli, para a explicação das estruturas de todas as membranas celulares, reveladas pelo microscópio eletrônico. Observou-se que as membranas celulares são compostas de duas camadas densas de 20 Å separadas por uma zona transparente de 35 Å. Robertson sugeriu que as duas camadas densas representam os grupos polares dos fosfolipídicos, nos quais se fixa por adsorção, um filme protéico. A zona transparente corresponde aos grupos apolares das duas camadas monoc moleculares de fosfolipídeos ( fig. Nº 1).

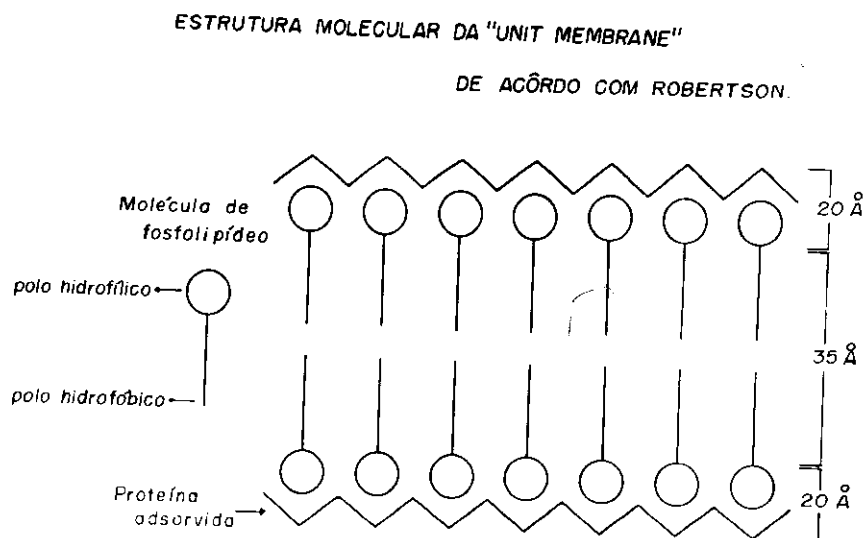


Figura Nº 1. Esquema da estrutura molecular da membrana plasmática, de acôrdo com a teoria da "unit membrane" de Robertson.

Recentemente, os trabalhos com microscopia eletrônica têm, aparentemente, comprovado essa hipótese. Assim, Buvat (1958, 1963), trabalhando com Elodea, e Grun (1963), com raiz jovem de Solanum, encontraram uma estrutura que pode ser classificada como "unit membrane". Também, Thomson (1966), observando a ultra estrutura do plasmalema em laranjas, verificou que a membrana é assimétrica, sendo a camada exterior mais espessa (40 Å), do que

a interior (30 Å). A zona compreendida entre as duas camadas densas apresenta-se transparente e descontínua. Pontes pequenas, opacas, atravessam a zona luminosa em intervalos regulares, fazendo a ligação entre essas camadas. Provavelmente, nessas regiões, a membrana é composta de pequenas sub-unidades; sabemos que uma estrutura composta de dois filmes monomoleculares, é um sistema facilmente modificável, podendo acarretar formação de sub-unidades. Mas até que outras investigações sejam feitas, a hipótese da estruturação do plasmalema em sub-unidades não é geralmente aceita. A estruturação em sub-unidades poderia ser relacionada com a presença de poros na membrana.

Num dos mais recentes simpósios sobre aspectos gerais de membranologia, realizado em março de 1967, em Ste. Marguerite, Canadá, Robertson discutiu o seu conceito da "unit membrane": as membranas biológicas são formadas por duas camadas lipídicas, com as cadeias carbônicas, não polares, no centro da membrana, e os fins-polares voltados para fora. As superfícies polares são cobertas por filmes unimoleculares não lipídicos. A superfície exterior difere quimicamente da interior, e assim a membrana é uma estrutura quimicamente assimétrica. Robertson deu ênfase especial aos problemas de sub-estrutura da membrana. Foram debatidos diversos outros problemas, e, entre eles, modelos de fosfolipídeos para estudos de difusão passiva: diferentes fosfolipídeos formam membranas exibindo permeabilidade diferencial para cátions e ânions, e troca por difusão pode ocorrer; e a presença de  $Ca^{++}$  pode ter efeito crítico sobre a permeabilidade dessas membranas.

A ultraestrutura determina a permeabilidade do plasmalema, de modo que algumas substâncias atravessam a membrana e outras não. Com respeito às regras que regulam a entrada e saída das substâncias químicas das células vegetais, podemos distinguir dois grupos: eletrólitos e não eletrólitos. As substâncias eletrolíticas não seguem as simples leis de difusão ao penetrar nas células, mas podem ser absorvidas individualmente por meio da permeabilidade chamada de ativa, a custa da energia do ATP celular. Os não eletrólitos, penetram geralmente na célula vegetal por simples difusão; as membranas plasmáticas atuam neste caso como barreiras que diminuem a velocidade da penetração.

A água pertence ao grupo dos não eletrólitos com um diâmetro molecular de cerca 2 Å; e a sua entrada ou saída de uma célula se faz por meio de difusão das moléculas, ou por poros, ou por entre os filmes monomoleculares. Um transporte ativo de água através das membranas não foi provado até hoje. Sabemos que os lípi -

deos que constituem a membrana, não impedem a passagem da água. - As moléculas dos fosfolipídeos se afastam e se unem, devido ao seu movimento térmico, permitindo assim a passagem das moléculas de - água. E foi observado por Levitt (1956), que substâncias com peso molecular menor que 60, podem atravessar as membranas, embora não sejam solúveis em lipídeos.

Constatou-se por inúmeras experiências (plasmólise, etc.) que a água pode atravessar o plasmalema, em ambos os sentidos, - com relativa facilidade; entretanto, existe uma série de fatores - que influenciam a sua permeabilidade, tais como: carga elétrica da membrana, presença de outros íons, bem como a idade da célula, luz, temperatura, etc. Maximov e Mozhaeva (1944), observaram que o - protoplasma de células jovens e senescentes, é mais permeável para água e sais, do que o de células adultas.

O efeito de sais sôbre a permeabilidade para a água tem sido extensivamente estudado, e êste é o objetivo do presente trabalho. Alguns dos importantes trabalhos sôbre o assunto, são de Osterhout (1922), Brooks (1941), Davson e Danielli (1952), Heil - brunn (1952). Os autores concluíram que o efeito geral de sais com cátions monovalentes, é aumentar a permeabilidade (diminui a resistência), enquanto que os sais com cátions de valência mais alta, diminui a permeabilidade (aumenta a resistência). Nêsses traba - lhos, foram mais estudados os íons pronunciadamente antagônicos, principalmente os dos  $K^+$  e  $Ca^{++}$ , cujos efeitos estudaremos também neste trabalho.

Höber (1945) e Heilbrunn (1952), resumiram, sôbre o assunto, uma grande parte da vastíssima bibliografia da fisiologia-geral, verificando, que de um modo geral,  $Ca^{++}$  diminui e  $K^+$  aumenta a permeabilidade. Mais tarde, Fischer (1956), citou um grande número de trabalhos sôbre os efeitos do  $Ca^{++}$  e  $K^+$  na superfície - do citoplasma da célula vegetal,  $Ca^{++}$  diminuindo e  $K^+$  aumentando, de modo geral, a permeabilidade para a água. Guttenberg e Beythien (1951), observaram que soluções de  $CaCl_2$  diminuem a permeabilidade, enquanto que soluções de  $KCl$  aumentam. Mas uma mistura dos dois sais não produz nenhum efeito. Hope and Walker (1961), trabalhando com Chara, mostraram que a resistência e potencial da membrana foram grandemente dependentes da concentração dos íons no - meio externo, particularmente o  $K$ : a resistência e magnitude do potencial caem, conforme a concentração do  $K^+$  aumenta, indicando um aumento da permeabilidade da membrana. O íon  $Ca^{++}$  produziu



efeito contrário. Waisel (1962), trabalhando com raiz de cevada, demonstrou que íons bivalentes, como o  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , diminuem a permeabilidade seletiva da membrana exterior do citoplasma.

As transformações que ocorrem entre diferentes estados sub-estruturais das membranas, geralmente são feitas por deslocamentos catiônicos, envolvendo, principalmente, cátions monovalentes e divalentes; assim os filmes de fosfolipídeos podem ser alterados, quando os radicais se ligam a cátions, como  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$ . A idéia que motivou o presente trabalho é baseada nessa hipótese, e pode ser esquematizada da maneira ilustrada pela figura Nº 2.

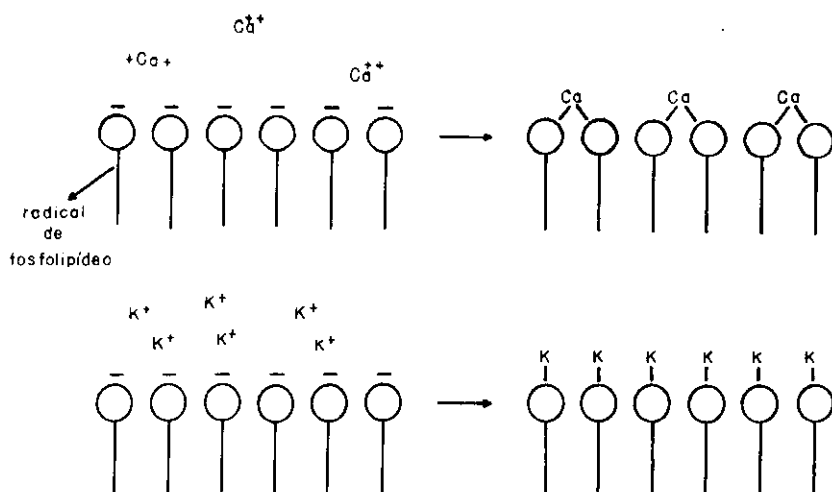


Figura Nº 2. Alteração da estrutura da membrana, pela ligação dos radicais de fosfolipídeos, a íons monovalentes, como o  $\text{K}^+$ , e bivalentes, como o  $\text{Ca}^{++}$ .

A Ca-membrana é estabilizada mecânicamente, devido a ação de "pinça" dos íons  $\text{Ca}^{++}$ ; é insolúvel, isto é, pouco dissociada, e assim, menos hidrófila. A K-membrana é dissociada, hidrófila, instável, sofrendo os grupos polares repulsão eletrostática entre si. Estas propriedades causam uma maior permeabilidade passiva da K-membrana e uma menor da Ca-membrana.

Relacionamos também o efeito do ácido etileno diamino-tetracético (EDTA), e da auxina, ácido B-indol acético (IAA), com

o efeito dos íons sôbre a permeabilidade. O EDTA é um complexador de íons bivalentes, principalmente do  $\text{Ca}^{++}$ . De acôrdo com a nossa hipótese, tôda célula tratada com EDTA, ficaria com uma quantidade reduzida de  $\text{Ca}^{++}$  na membrana; os lugares ocupados por êsses íons na membrana, seriam substituídos pelo  $\text{K}^+$  vindo do interior da célula, onde existe em grande quantidade. Essa substituição aumentaria a permeabilidade da célula.

Também foi estudado o efeito da auxina IAA, pois uma revisão da literatura mostrou que essas substâncias, produzem mudanças na absorção de vários materiais, inclusive da água, pelas células vegetais. Isso levou muitos investigadores a propor efeitos diretos da auxina sôbre a membrana, como o modo principal de ação dela; o primeiro dêles foi Bungenberg de Jong (1935, 1937). Mais tarde, Reinders (1938, 1942), e Commoner e Mazia (1942), observaram que as auxinas aumentam a absorção de água, por certas espécies de tecidos vegetais, e Veldstra (1947, 1949), e Brian e Rideal (1952), reafirmaram a hipótese acima, sem contudo explicar a causa de tal aumento na absorção da água. O IAA poderia atuar de modo semelhante ao EDTA, quelando o  $\text{Ca}^{++}$ , de modo indireto, como foi proposto por Bennet-Clark (1956). Sabemos que o IAA provoca vários efeitos numa célula: aumenta a respiração, aumenta a síntese de RNA, a síntese de ácidos pécticos, etc. Algumas dessas substâncias são queladoras de íons, como  $\text{Ca}^{++}$ ; podem retirar o  $\text{Ca}^{++}$  das suas ligações na membrana, alterando a estrutura da mesma e o  $\text{Ca}^{++}$  continua a existir no ambiente na forma de outros compostos. Na literatura são encontrados alguns trabalhos onde se observa uma relação entre IAA e Ca. Assim Bennet-Clark (1956), Coil e Bonner (1957), observaram que concentrações relativamente altas de  $\text{Ca}^{++}$ , inibe fortemente o crescimento de segmentos de coleoptila, enquanto  $\text{K}^+$  a aumenta.

O objetivo principal do nosso trabalho foi o de estudar, diretamente, os efeitos dos íons reconhecidamente antagônicos,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , sôbre a permeabilidade da célula grande de Nitella, e indiretamente, pelo emprêgo de EDTA e de IAA.

## II. MATERIAL E MÉTODOS.

### 1. Descrição do material.

A planta escolhida para nossas experiências foi Nitella cernua Braun, (Figura Nº 3), uma alga verde de água doce, da família das Characeas; esta alga permite o estudo da permeabilidade de uma única célula, e até possibilita comparar a alteração da passagem de água, produzida em partes diferentes de uma célula.

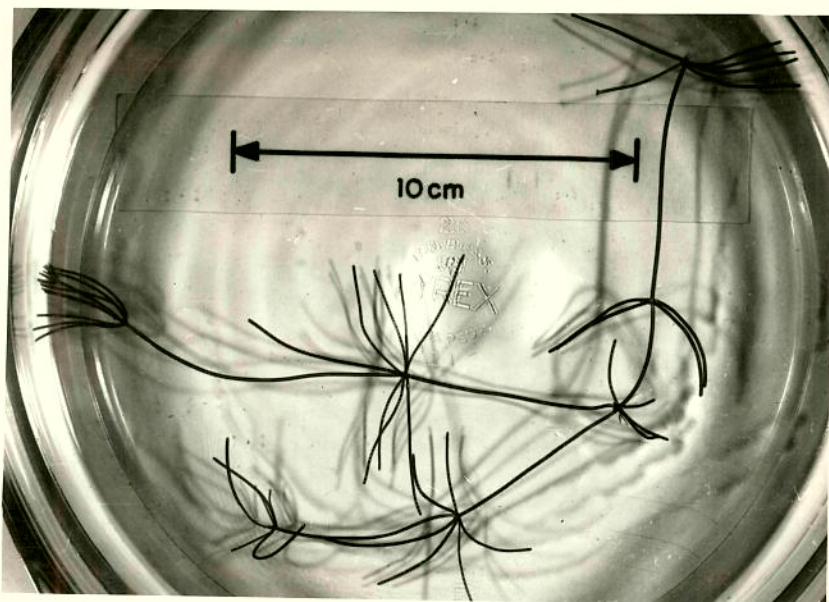


Figura Nº 3. Aspecto geral de um talo de Nitella.

Nitella cernua Braun, é uma das poucas espécies dióicas de Nitella. É o maior representante do gênero, podendo possuir entre-nós com até 50 cm de comprimento. Os entre-nós, constituídos por uma única célula macroscópica, e algumas células terminais de tamanho microscópico, são cilíndricos e isodiamétricos. Contém vários núcleos e muitos cloroplastos discóides, como os mesmos pigmentos encontrados na divisão Chlorophyta. Amido é a principal substância de reserva. Os plastos são fixos, pois estão presos na camada exterior do citoplasma, que é imóvel. A outra camada do citoplasma, limitada pelo vacúolo, têm um movimento constante de rotação: numa metade, o citoplasma desloca-se até a

extremidade e voltando em sentido inverso, na outra metade; existem duas zonas sem cloroplastos, que separam as correntezas opostas. Mais de 95 % da célula está ocupada pelo vacúolo.

Os nós são formados por mais ou menos 12 células microscópicas. Aí aparecem as poucas ramificações que têm crescimento indefinido, e as folhas dos verticelos, com um número médio de 6, possuindo umas células apicais muito pequenas. Uns ramos laterais são dotados de heliotropismo negativo e têm a função de fixar a alga no substrato, onde se enterra por meio de rizóides aclorofilados. A reprodução sexuada é oogâmica; os órgãos sexuais aparecem no final do verão e no outono, e mais raramente na primavera; são reunidos em glomérulos apicais, envoltos por mucilagem.

O porte da Nitella varia extremamente, de acordo com as condições do ambiente, sendo que o comprimento do entre-nó varia bastante com as condições de luminosidade, ficando bem mais comprido quando cresce em lugar pouco iluminado.

Segundo Arens (1951), a parede celular de Nitella cernua Braun, têm três camadas distintas; nos entre-nós de 6 a 20 cm de comprimento, a espessura da membrana varia de 7 a 11 micra; a camada interna é formada de celulose pura, a externa têm a natureza de uma cutícula permeável e a média contém pectina e provavelmente calose. É frequente a deposição de carbonato de cálcio na membrana, porém, nunca usamos as células com incrustações de  $\text{CaCO}_3$ .

Estudos referentes aos constituintes da célula de Nitella, realizados por Hoagland e Davis (1923), revelaram a presença dos seguintes elementos: N, Mg, Al,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  e Ca, ocorrendo no vacúolo e na parede da célula. Mais tarde, Brooks (1951), detectou por meio de íons marcados, a presença de  $\text{Na}^{24}$ ,  $\text{P}^{32}$  e  $\text{K}^{42}$  no vacúolo da célula. Sabe-se que a célula de Nitella chega a acumular  $\text{K}^+$  numa quantidade igual a 1065 vezes a existente no exterior (Giese, 1960).

É importante salientar que êsse excelente material, já foi usado inúmeras vezes em pesquisas fisiológicas. Citamos alguns trabalhos encontrados na bibliografia: Collander (1936), fez observações da entrada de glicerol em célula de Chara; Arens (1939) mediu a pressão de turgor de 3 a 10 at. em células de Nitella cernua Braun, sendo a média 6,0 - 6,2 at.; Osterhout (1936, 1947), utilizou as células gigantes de Nitella e Chara, para proceder uma análise de íons do suco celular. Briggs (1957), fez estudos da permeabilidade do plasmalema de células de Nitella e observou a resistência à passagem de íons, oferecida pelo plasmalema; Oda (1962) mediu o potencial da membrana de células entre-nodais de Chara.

braunii Gmelin., em diferentes concentrações de KCl; K<sup>+</sup> em concentração maior no ambiente, provoca excitação celular que depolariza a célula, aumentando a permeabilidade e diminuindo a resistência.- Gunar (1964), usando Nitella flexilis Ag., estudou a importância da camada superficial do protoplasma na geração de potencial na célula vegetal e observou que o plasmalema é o responsável pela permeabilidade e pela manutenção de desequilíbrios iônicos entre o ambiente e o interior celular. Ambrose (1965), observou a parada do movimento protoplasmático durante potenciais de ação em Nitella. Todos êsses trabalhos realizados com Nitella ou Chara, obtendo resultados excelentes, mostram que êsse material é muito bom para pesquisa.

A Nitella usada nos nossas experiências foi trazida do lago do Horto Florestal "Navarro de Andrade" de Rio Claro, Estado de São Paulo, onde a Nitella se desenvolve muito bem. Nitella cernua foi encontrada nêsse lago em 1939, por Arens. Hoje é encontrada em outros lugares onde não existia antigamente, o que parece indicar a expansão da espécie.

## 2. Métodos experimentais.

Usamos nas nossas experiências as células isoladas das suas ramificações. As células entrenodais de Nitella que foram usadas, possuíam em média, 12 cm de comprimento, 1 mm de diâmetro e 110 mg de peso. Para obtenção dêsses entre-nós, procedia-se da seguinte maneira: os talos de Nitella eram retirados do tanque que ficava ao ar livre, e com uma pequena tesoura separava-se grande número de entre-nós, que eram colocados num aquário, onde permaneciam num período mínimo de 2 horas, para se recuperar do choque traumático sofrido. Após êsse tempo, as células podiam ser usadas nas experiências.

Foram escolhidos dois métodos para estudar a permeabilidade:

- a. Transpiração de células isoladas.
- b. Medição direta, através da saída ou entrada de água.

a. Transpiração de células isoladas. A transpiração, isto é, a perda de água por evaporação, pressupõe a passagem de água através do plasmalema, e poderá, portanto, depender da permeabilidade do mesmo.

Para o estudo da transpiração, foi usado o método de pesagens rápidas em balanças de torsão. Apesar das falhas, êste método

do têm sido amplamente usado no estudo da transpiração, de plantas naturais e cultivadas, por muitos pesquisadores: Rawitscher (1943), Coutinho (1956, 1960 e 1962), Ferri (1960), Laboriau (1961), Meguro (1963), etc., e também entre nós já foi empregado.

O tratamento da célula foi feito do seguinte modo: das células separadas, eram escolhidas duas, que fôsem o mais iguais possíveis, quanto à idade, tamanho e peso. Uma era colocada em água: célula controle. A outra sofria tratamento, com uma solução de KCl, CaCl<sub>2</sub>, EDTA, IAA, durante tempo limitado. Após, eram retiradas e enxugadas cuidadosamente com papel de filtro, para retirar o excesso de água. Em seguida, as células de controle e experimento eram colocadas nas balanças e pesadas, simultaneamente, em condições idênticas de temperatura, umidade relativa e luminosidade, dentro do laboratório e excluindo-se dentro do possível, a movimentação de ar. A perda de água foi calculada em % sobre o peso inicial das células.

Balança de torção. Foram usadas balanças marca "Jung", com capacidade 6,150 gr e sensibilidade de 0,5 mg. As pesagens foram feitas em intervalos de 3, 4 e 5 minutos, conforme a experiência, durante um período mínimo de 18 minutos e máximo de 30 minutos. As células perdem água muito rapidamente: até 10 ou 15 minutos apresentam relativa turgidez; após, começam a perder gradativamente a turgidez. As experiências foram interrompidas antes que as células entrassem em colapso, por falta de turgor.

Temperatura e umidade relativa. Ao mesmo tempo que as leituras de peso, foram feitas leituras de temperatura e umidade relativa ambiente, com um polímetro Lambrecht. Este é constituído de um termômetro de Hg e um higrômetro de cabelo. O termômetro dá leituras de 0 a 100 % de UR.

Superfície celular. Para calcular a superfície da célula o diâmetro e o comprimento das células usadas foram medidos. O comprimento foi medido com papel milimetrado. O diâmetro foi medido no microscópio, com ocular de medição.

b. Medição direta, através da saída ou entrada de água. Consultando a bibliografia, verificou-se que muitos pesquisadores já usaram este método, para medição do fluxo de líquido de célula Arens (1951), Dainty and Hope (1959), Dainty and Ginzburg (1963) Fensom and Dainty (1963), e outros.

Para fazer a medição direta da permeabilidade, a célula foi tratada unilateralmente; delimitando a porção tratada da não tratada, ficava um fio passado por lanolina, que enrolado ao redor da célula, separava as duas porções e impedia a subida da solução pela superfície da célula. Essa extremidade delimitada era colocada num tubo de ensaio, ficando mergulhada na solução durante um tempo determinado. O restante da célula, ficava exposto ao ar saturado de água, pois o conjunto permanecia numa câmara úmida, com a finalidade de impedir a perda de água da célula. Decorrido o tempo de tratamento, a célula era retirada do tubo de ensaio, e a porção tratada era enxugada cuidadosamente com papel de filtro; após, passava para um conjunto que é ilustrado na figura Nº 4.

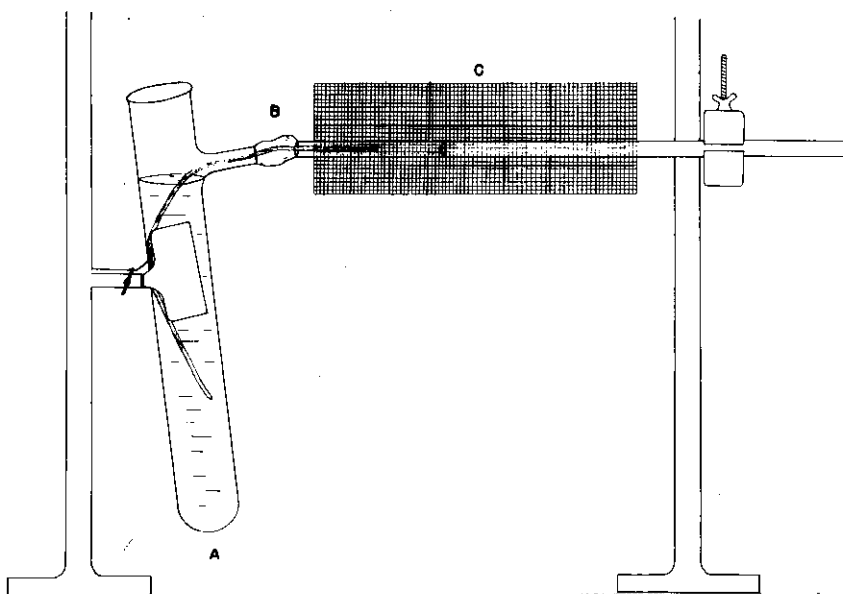


Figura Nº 4. Esquema do conjunto para a medição do fluxo de líquido na célula de Nitella.

A figura mostra o conjunto que foi montado com dois tubos de vidro, A e C; o tubo A possuía 1,5 cm de diâmetro por 14 cm de comprimento e uma saída lateral; o tubo C era capilar (3 mm). O tubo A continha água, e o tubo C, ficava vazio. Após o tratamento, a célula era colocada nêsse conjunto, de modo que a porção não tratada era enfiada no tubo que continha água (A), e a porção tratada era enfiada no tubo vazio (C). A porção da célula que ficava entre os dois tubos de vidro, era bem protegida com pasta de lanolina (B). Foram feitas observações da possível absorção de água pela porção não tratada (contrôle), e da possível perda de água pela porção -

tratada. As leituras foram feitas em intervalos de 20 minutos, durante a primeira hora e depois em intervalos maiores, num total de 20 horas de observações.



A. O efeito sôbre a membrana inerte da célula.

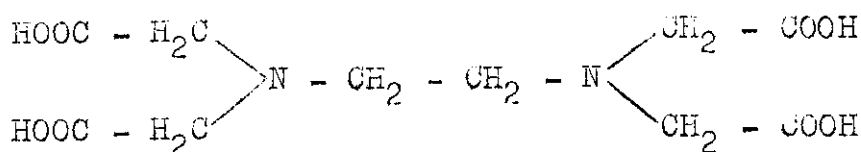
III. O efeito do EDTA sôbre a resistência mecânica da membrana externa da célula.

O EDTA é um quelador de íons bivalentes, notadamente do  $Ca^{++}$ ; com seu uso pode-se retirar o  $Ca^{++}$  das membranas da célula. Com essa finalidade, células foram tratadas com EDTA.

Porém, fazendo as experiências preliminares, para determinar os limites de exposição da célula do Nitella à solução de EDTA, deparamos com um fenômeno que inutilizou uma série de experiências: as células dos entre-nós explodem, quando expostas a uma solução  $10^{-3}$  M de sal sódico ou potássico de EDTA, durante 25 minutos ( em média). Ocorre, portanto, o fenômeno conhecido sob o nome de plasmoptise.

Na bibliografia, não encontramos informações sôbre este fenômeno. Brown, Sandino e Elliker (1962), trabalhando com 3 espécies do gênero Streptococcus, Str. lactis, Str. cremoris e Str. diacetylactis, observaram a lise dessas bactérias sob a ação do EDTA, que enfraquece a membrana inerte das células, mas não conduz a uma plasmoptise.

O EDTA é um ácido orgânico, complexador de cátions plurivalentes, de fórmula geral  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ . A fórmula estrutural é a seguinte:



O peso molecular é 292,25; o EDTA quando puro é insolúvel em água.

Foram usadas soluções  $10^{-3}$  M de EDTA, de pH = 4,5 a 5. Para solubilizar o EDTA foi usada solução saturada de NaOH ou KOH, que era gotejada nos cristais de EDTA, até que se conseguisse a solubilização total; em seguida, era completado o volume desejado com água destilada. Com a adição do hidróxido, a solução ficava com pH básico; para levar o pH até a acidez, foi empregada uma solução diluída de ácido acético. Empregamos sempre soluções ácidas de EDTA no nosso trabalho, pois de acordo com Toribara e Koval (1961), qualquer quantidade de EDTA quelará completamente uma quantidade equimolar de Ca, se o pH é mantido próximo de 5. Como a nossa finalidade era quelar o Ca da membrana, usamos sempre soluções ácidas de EDTA.

### a. Experimentação.

A experimentação foi a seguinte: as células de Nitella eram retiradas do aquário (onde ficavam as células prontas para a experimentação), e era medido o seu comprimento com uma régua; em seguida, as células eram colocadas em placas de petri, contendo a solução de EDTA; as placas eram tampadas. O comprimento da célula era medido ao ser colocado na solução, e depois em intervalos de 5 minutos, durante um período mínimo de 25 minutos.

### b. Resultados.

Na tabela 1, estão os resultados obtidos em relação ao aumento de comprimento das células na solução de EDTA. Esses resultados mostram que a porcentagem média de aumento de comprimento de 22 células foi 0,78 %. A figura Nº 5 apresenta o resultado da experiência Nº 13 da tabela 1.

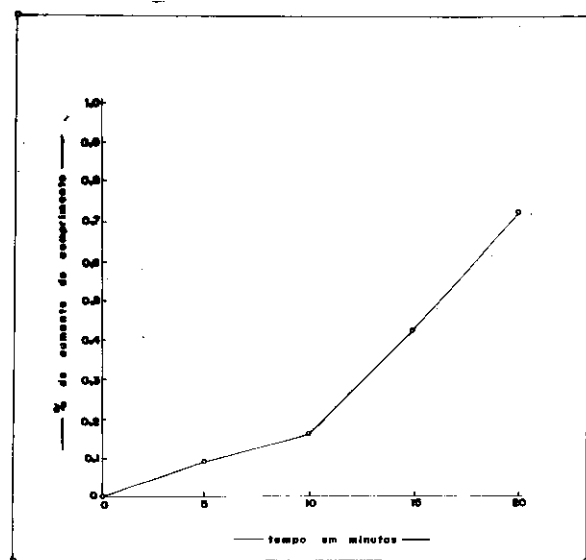


Figura Nº 5. Aumento de comprimento da célula de Nitella, em solução de EDTA,  $10^{-3}$  M.

Geralmente, após 15 minutos, na solução de EDTA, as células já apresentavam um aumento de comprimento. Depois de

Exp.	Exp. à sol. EDTA, 0,001 M.	Compr. da célula em cm.		Aumento em cm. verif. nesses temp.	% aumen- to.
		em minutos	início		
1	10	14,9	15,0	0,1 cm	0,67 %
2	10	20,6	20,7	0,1 cm	0,48 %
3	20	25,2	25,4	0,2 cm	0,79 %
4	25	23,7	24,4	0,7 cm	2,95 %
5	20	22,3	22,5	0,2 cm	0,89 %
6	5	23,3	23,6	0,3 cm	1,28 %
7	5	26,9	27,0	0,1 cm	0,37 %
8	5	25,4	25,6	0,2 cm	0,78 %
9	15	17,5	17,6	0,1 cm	0,57 %
10	20	17,4	17,5	0,1 cm	0,57 %
11	20	30,0	30,3	0,3 cm	1,00 %
12	15	26,9	27,0	0,1 cm	0,37 %
13	20	26,2	26,4	0,2 cm	0,76 %
14	20	23,2	23,4	0,2 cm	0,86 %
15	25	13,2	13,3	0,1 cm	0,75 %
16	20	21,1	21,2	0,1 cm	0,47 %
17	25	17,2	17,3	0,1 cm	0,58 %
18	25	24,0	24,2	0,2 cm	0,83 %
19	20	26,0	26,1	0,1 cm	0,37 %
20	20	18,0	18,1	0,1 cm	0,55 %
21	15	17,9	18,0	0,1 cm	0,50 %
22	25	20,7	20,9	0,2 cm	0,96 %

Média: 0,17 cm Média: 0,78 %  
=1,7 mm.

Tabela 1.

Aumento de comprimento de células de NITELLA, colocadas em EDTA, 0,001 M, em diferentes tempos de exposição.

20 a 25 minutos na solução de EDTA, as células explodiam. As células que mais demoraram para arrebentar levaram 45 minutos.

A célula pode arrebentar de 2 maneiras: fraccionando-se em 2 partes, rasgando a membrana em toda a sua circunferência, ou formando furos que, macroscopicamente não se repara. - Notava-se, às vezes, que a célula perdia a turgescência a partir de um momento, mas o furo se fechava aparentemente por meio de um coágulo citoplasmático e a célula voltava à turgescência. Macroscopicamente, traduz-se isso em movimentos da própria célula, pois a célula altera rapidamente a sua forma, quando perde e recupera, alternadamente, o turgor. Strugger (1926), já observou em pelos absorventes, que a plasmoptise pode se dar repetidas vezes sob o efeito de ácidos.

Algumas células foram tratadas num determinado local com a solução, e arrebentaram exclusivamente na zona tratada.

Admitimos que a retirada de cálcio, da ligação cálcio-pectina foi responsável pela alongação da célula, e conseqüente explosão; portanto, colocando a célula numa solução que continha EDTA e  $Ca^{++}$ , esse fenômeno não devia aparecer. Fizemos esse tipo de experiência, usando uma mistura de EDTA 0,001 M e  $CaCl_2$  0,001 M, em proporções iguais; células assim tratadas, não sofreram alongação, nem explosão ocorreu.

### c. Discussão.

A membrana celulósica é formada de celulose, hemicelulose e compostos pécnicos.

O composto fundamental das substâncias pécnicas é o ácido poligalacturônico, que se mantém inalterado na protopectina e se torna parcialmente metilado nas pectinas. A carboxila das pectinas pode formar sais. O  $Ca^{++}$  pode ligar dois grupos carboxílicos, formando uma ponte de cálcio entre dois filamentos de pectina, que é uma combinação insolúvel em água e serve de cimento incrustante de celulose. Essa ponte de  $Ca^{++}$ , que liga as cadeias de pectina da parede da célula, é um fator que limita a expansão celular. (Figura Nº 6).

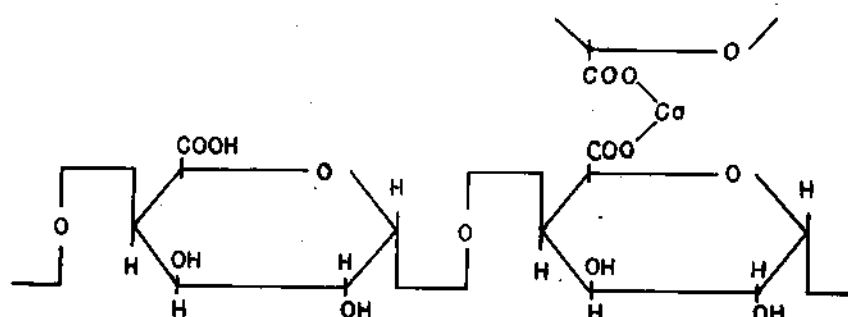


Figura Nº 6. Estrutura em cadeia do ácido péctico, mostrando uma "ponte" de  $\text{Ca}^{++}$  entre duas cadeias vizinhas

O EDTA provoca a transformação do cálcio-pectina insolúvel em sal solúvel, potássico ou sódico, do ácido galacturônico. Dá-se assim, a dissolução da incrustação pelo pectato de cálcio, e a membrana celulósica perde a sua resistência mecânica. De acordo com Probyne e Preston (1961), a membrana da célula de *Nitella opaca* consiste de lamelas que podem ser separadas, renovando as substâncias pécticas, após o tratamento com oxalato de amônia que é um agente quelante. O EDTA é um quelador, que age do mesmo modo que o oxalato de amônia, destruindo a ligação cálcio-pectina. Tais autores acharam, também, que os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  agem sobre a mesma membrana. O íon  $\text{Ca}^{++}$  torna-se menos esticável e com isso reduz o crescimento. O íon  $\text{K}^+$  torna a membrana mais distensível, o que favorece o crescimento.

#### 6. EDTA e auxina.

Os agentes quelantes causam um aumento na elongação; como a mais típica função das auxinas é em direção ao alongamento da célula, a auxina foi imaginada atuar como um agente quelante. Segundo Bennet-Clark (1956), a auxina pode causar e-

longação das células, por quebrar a ponte de cálcio, por efeito quelante do hormônio de crescimento e por metilação do grupo carboxil da pectina. Os grupos carboxílicos, sendo ligados aos pares por íons  $\text{Ca}^{++}$ , cimentam a celulose, dando condições diferentes à membrana, e tornando-a mais resistente. Formação do metil ester promoveria crescimento, ocupando a carboxila; assim o sal de  $\text{Ca}^{++}$  não poderia se formar. Mas segundo Cleland (1960), e Thimann e Takahashi (1961), nenhuma auxina sózinha, nem auxina mais EDTA, libertam quantidade apreciável de cálcio do tecido de coleoptila de aveia. Esses autores usaram EDTA nos seus trabalhos, para quelar o cálcio da membrana inerte. Concluíram que não há bases experimentais reais, para a hipótese de metilação e descalcificação, e que o modo pelo qual a auxina modifica a extensibilidade plástica da parede celular, pode ser mais intimamente relacionada com o metabolismo e com a alteração do plasmalema, onde parece haver um aumento de permeabilidade, que pode ser atribuída a uma fixação de Ca; não por IAA, diretamente, mas por produtos metabólicos (ácido galacturônico, RNA, etc.) que acumulam sob o efeito do IAA.

e. Cálculo da tensão sofrida pela membrana da célula no estado de turgor.

Nos tecidos vegetais tratados por Cleland (1960) ---, Thimann e Takahashi (1961), não se observou uma plasmoptise, por ser a resistência da membrana inversamente proporcional ao diâmetro celular: quanto menor fôr o diâmetro, maior será a resistência, e vice-versa. Como as células desses tecidos são pequenas, a resistência é grande; mas o EDTA causa dilatação da membrana, também em células de volume pequeno, fato esse que nunca foi considerado na literatura.

Se uma célula possui, no estado de turgor, uma pressão interna conhecida, podemos calcular a tensão que a membrana está sofrendo. De acordo com Arens (1951), a célula de Nitella cernua Braun, possui no estado normal um turgor de 6 a 6,2 atmosferas. Essa pressão acarreta uma tensão da membrana. Sabemos que numa célula cilíndrica, como na de Nitella, a tensão sofrida pela membrana é anisotrópica, sendo que a tensão transversal é duas vezes a tensão longitudinal. Sob esta tensão a célula se alonga, mas esse alongamento não é inteiramente elástico.

Foi determinado que a membrana normal se rompe com pressões de 8 a 10 atmosferas (Arens, 1951). Com a dissolução do pectato insolúvel, a membrana se torna mais maleável, a célula aumenta de comprimento e quando se dá o rompimento, o turgor já diminuiu e a célula explode, sem dúvida, já com menos de 6 atmosferas.

Preston (1955), apresentou uma fórmula para cálculo de tensões transversais e longitudinais nas paredes das células vivas. Em células cilíndricas a tensão transversal é o dobro da tensão longitudinal. Em células esféricas, a membrana sofre uma tensão igual em todas as direções.

As fórmulas são as seguintes:

$$\begin{aligned} \text{Tensão transversal: } T_t &= \frac{Pr}{d} \\ \text{Tensão longitudinal: } T_l &= \frac{Pr}{2d} \end{aligned}$$

Sendo:

P = pressão interna.

r = raio.

d = espessura da membrana.

Sabendo a pressão, podemos calcular a tensão transversal e longitudinal de uma célula de Nitella, a tensão transversal de uma célula parenquimatosa e comparar os resultados. - A célula parenquimatosa, normalmente tem as suas dimensões mais ou menos iguais e, portanto, podemos considerar, que a sua membrana sofre uma tensão igual aquela de uma célula esférica.

Tensão em célula de Nitella:

$$P = 6 \text{ Kg/cm}^2 = 60 \text{ g/mm}^2.$$

$$r = 0,75 \text{ mm.}$$

$$d = 0,005 \text{ mm.}$$

Tensão transversal em Nitella:

$$T_t = \frac{P r}{d} = \frac{60 \times 0,75}{0,005} = 9.000 \text{ g/mm}^2$$

Tensão longitudinal em Nitella:

$$T_l = \frac{P r}{2 d} = \frac{60 \times 0,75}{2 \times 0,005} = 4.500 \text{ g/mm}^2$$

Tensão na célula parenquimatosa: (admitindo  $r = 0,025 \text{ mm}$ ).

$$P = 60 \text{ g/mm}^2.$$

$$r = 0,025 \text{ mm}.$$

$$d = 0,0025 \text{ mm}.$$

$$T = \frac{60 \times 0,025}{0,0025} = 600 \text{ g/mm}^2.$$

Se a célula parenquimatosa sob a pressão de 6 atmosferas, sofre uma tensão de  $600 \text{ g/mm}^2$ , podemos calcular a pressão necessária para que a membrana sofra uma tensão de  $9.000 \text{ g/mm}^2$ , sob a qual a membrana arrebenta.

$$P = \frac{T \times d}{r} = \frac{9.000 \times 0,0025}{0,025} = 900 \text{ g/mm}^2.$$

$$P = 900 \text{ g/mm}^2 = 90 \text{ Kg/cm}^2.$$

Para arrebentar a célula parenquimatosa, seriam necessárias 90 atmosferas, que é um turgor nunca atingido por nenhuma célula vegetal em condições normais. Além disso, nos tecidos estudados, as células estão em contacto com outras células; assim, a força é compensada pelas células vizinhas, que impedem um aumento, muito grande, do volume da célula sob a pressão, e venha a estourar. Portanto, em tecidos, é difícil a constatação da dilatação celular, observado por nós em Nitella, que pode conduzir à ruptura da membrana.

Existe assim, sem dúvida, um efeito antagônico dos íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$  sobre a membrana inerte da célula. Nós estudamos especificamente a ação do  $\text{Ca}^{++}$  que mantém a resistência mecânica. Mas a substituição do  $\text{Ca}^{++}$  pelo  $\text{K}^+$ , como pectato de potássio deve diminuir a resistência mecânica, como foi constatado pelos autores acima citados. E na quelação do  $\text{Ca}^{++}$ , dos pectatos, por EDTA, deve sempre ocorrer uma substituição, pelo menos parcial, do  $\text{Ca}^{++}$  pelo  $\text{K}^+$  do interior da célula.



Resumindo, pode-se concluir:

1. O EDTA, em contacto com uma célula de Nitella, - provoca nessa célula:

- a. Aumento do comprimento, após 15 minutos de exposição. O aumento médio de comprimento de 22 células foi 0,78%.
  - b. Causa plasmólise, depois de 20 a 25 minutos na solução. A célula pode arrebentar de 2 maneiras: fraccionando-se em 2 partes ou formando furos, que não se repara, macroscopicamente.
2. Juntando  $\text{Ca}^{++}$  à solução de EDTA, há inibição do efeito: não ocorre plasmólise nem aumento de comprimento.
3. A tensão sofrida pela célula de Nitella é anisotrópica, sendo a tensão transversal duas vezes a tensão longitudinal. Partindo de uma pressão interna conhecida, no estado de turgor, calculou-se essas tensões. A tensão longitudinal é  $4.500 \text{ g/mm}^2$ ; e a tensão transversal é  $9.000 \text{ g/mm}^2$ , sob a qual, a membrana arrebenta, devido a quebração do  $\text{Ca}^{++}$  pelo EDTA.

B. O efeito sobre as membranas citoplasmáticas.

IV. A transpiração de células isoladas.

1. O efeito dos íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$ .

Os efeitos antagônicos dos íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$ , sobre a transpiração do vegetal superior, foram largamente estudados; - muitíssimos trabalhos foram realizados, sem que se tivesse chegado a resultados conclusivos.

A literatura sobre a influência dos sais minerais na transpiração do vegetal superior, foi resumida em trabalho de Biebl (1958). Este concluiu, que apesar do grande número de dados existentes, não se pode chegar a conclusões definidas, devido a existência de muitos resultados contraditórios; mesmo quanto ao efeito antagônico dos sais de  $K^+$  e  $Ca^{++}$ , não se pode assegurar se o  $Ca^{++}$  reduz,  $K^+$  aumenta a transpiração de uma maneira geral, pois a análise dos efeitos de sais sobre folhas é muito dificultada pela estrutura anatômica complicada e pela ação do aparelho estomático.

Por isso, tentamos verificar êsses mesmos efeitos num sistema mais simples, constituído por uma única célula. Usando o método de pesagens rápidas em balança de torção, fizemos o estudo da transpiração de células inteiras isoladas de Nitella tratadas com solução de  $KCl$  e  $CaCl_2$ , em diferentes concentrações, como explicaremos mais abaixo.

a - Experimentação. Em qualquer trabalho experimental é muito importante ter-se um controle; no presente trabalho o controle foi o seguinte: comparação da transpiração de 2 células não tratadas (células controle). Fizemos uma série de experiências comparando, simultaneamente, duas células sem tratamento para verificar qual a variabilidade do comportamento. Nessas experiências, as curvas de perda de água das duas células, praticamente, coincidiram. Não existiu uma variabilidade maior de transpiração, que pudessem introduzir um erro apreciável. A figura número 7 mostra as curvas obtidas nessa experiência. Escolhemos duas células, praticamente iguais em tamanho e peso, mas como é natural, raramente foram absolutamente iguais. Então para construir a curva de transpiração, reduzimos os valores iniciais, em peso, das duas células, a um valor igual a 100% e daí calculamos a % em perda que a célula sofria um determinado intervalo de tempo. O método de cálculo fica mais --

compreensível tomando-se um exemplo. Assim, os valores reais - obtidos na pesagem de duas células controle, de mesma idade, - foram os seguintes-

Min. de pesagem	Pêso das células em mg.	
	1	2
0	58	57
3	53	52
6	49	48
9	45	44
12	41	40
15	37	36
18	33	32
21	29 m	28
24	25	24
27	22	21

Reduzindo os valores iniciais a um valor 100%, pode-se calcular a porcentagem em perda de água da célula. Assim, a célula Nº 1, nos 3 primeiros minutos, perdeu 5 mg.

Fazendo:

58 mg ..... 100 %

5 mg ..... x %

x = 8,6 % de perda.

Assim em 0 minutos de pesagem, a célula possuía 100 % do seu pêso; em 3 minutos de pesagem, a célula possuía 100-8,6= 91,4 % do seu pêso inicial.

Do 3º ao 6º minuto a mesma célula perdeu 4 mg, sendo:

53 mg ..... 100 %

4 mg ..... x %

x = 7,5 % de perda.

Portanto, no 6º minuto de pesagem, a célula possuía - 91,4-7,5 = 83,9 % do seu pêso inicial (valores 1 e da tabela 2).

Dessa maneira, foram feitos os cálculos da porcentagem em perda, por unidade de tempo, de duas células controle; em cada pesagem simultânea, das duas células, as leituras foram feitas em intervalos de 3 minutos, durante 18 minutos ou mais,

Minutos de pesagem.	Pêso da célula em % .										$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	
	1a	2a	1b	2b	1c	2c	1d	2d	1e	2e			
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	94,4	94,4	96,0	95,2	91,4	91,3	92,2	94,8	93,6	94,5	93,52	94,04	
6	90,4	90,2	91,9	92,7	83,9	83,7	90,6	93,0	88,5	88,7	89,06	89,66	
9	86,3	86,7	89,8	90,1	75,8	75,4	87,2	89,3	84,9	84,6	84,80	85,22	
12	82,0	82,9	87,6	87,4	67,0	66,4	85,5	87,4	81,2	80,3	80,56	80,88	
15	75,2	77,2	85,2	84,7	57,3	56,4	81,9	83,4	76,3	74,7	75,22	75,28	
18	71,6	73,2	80,8	79,0	46,5	45,3	77,0	79,3	71,2	68,7	69,42	69,10	

Tabela 2.

Dados obtidos na transpiração feita com cinco pares de células não tratadas. Os números indicam o pêso da célula em porcentagem, considerando o pêso inicial igual a 100%. Condições ambientais: UR = 71%, T= 25,7°C.

de acôrdo com as condições do ambiente (UR e T); foram realizadas 5 pesagens consecutivas (a, b, c, d, e, na tabela 2). As tabelas foram construídas usando o pêsso inicial igual a 100 %; os valores restantes como a % do pêsso restante da célula. Depois foi tirada a média das porcentagens de pêsso das células 1 e 2, para cada intervalo de tempo.

Esse método de cálculo de porcentagem foi utilizado, para obtenção dos valores usados na construção de todos os gráficos encontrados no presente capítulo.

Os valores médios  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$  da tabela 2, foram usados para a construção da figura Nº 7.

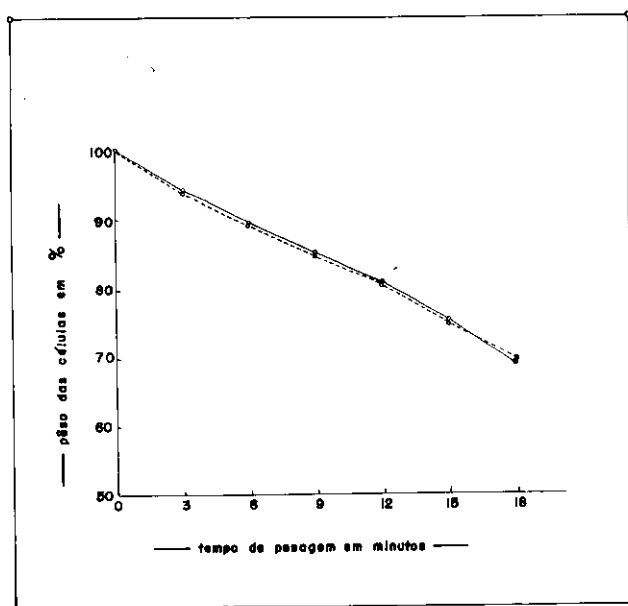


Figura Nº 7. Esta figura apresentadas curvas de transpiração de 5 pares de células não tratadas (valores médios  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$  da tabela 2). A diferença média de transpiração foi mínima, e as curvas quase coincidem.  $\bar{X}_1$  -----;  $\bar{X}_2$  —————; UR = 71 %; T = 25,7 °C.

A diferença entre  $\bar{x}_1 = 69,42$  e  $\bar{x}_2 = 69,10$  em 18 minutos de passagem é de 0,32 %. Esse valor está dentro do limite de 5 %, equivalendo dizer que não existe diferença nos resultados das células 1 e 2, portanto, a transpiração dessas células foi, praticamente, igual.

Durante as experiências preliminares, foi observado que as células jovens transpiravam mais do que as células adultas. A causa principal deve residir na permeabilidade diferente

do plasmalema. Tentamos comprovar essa observação e para essa finalidade, foram separados 2 grupos de 20 células: um grupo - era de células da extremidade do talo (principalmente a penúltima célula), portanto, bem novas; o outro grupo era de células do meio do talo, portanto, células adultas. Essas células ficaram em água. Foi comparada a transpiração de célula jovem com célula adulta. Nas 8 experiências realizadas, o resultado obtido foi sempre o mesmo: células jovens perdem mais água do que células adultas, como pode ser observado na figura Nº 8.

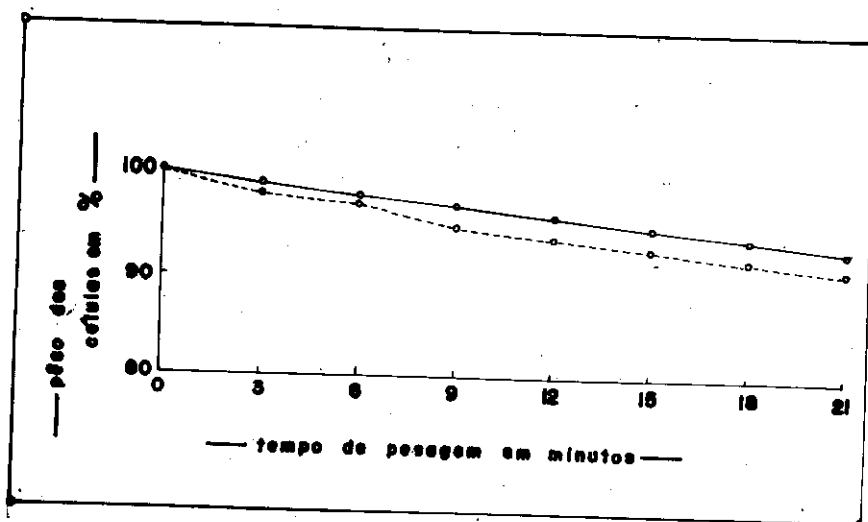


Figura Nº 8. Curva de transpiração, usando a média dos valores obtidos na comparação de células jovens com células adultas. Observe-se que célula jovem - perde mais água do que célula adulta.

\_\_\_\_\_ adulta; - - - - - jovem; UR= 89%; T= 21 °C.

A causa pode ser a seguinte: a água em que as células vivem, contém uma concentração regular de  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ . Assim, há uma espécie de pré-tratamento natural das células com  $\text{Ca}^{++}$ , que aparentemente é mais longo nas células adultas do que nas jovens; ou são outras as causas do fenômeno.

Em seguida, foram realizadas experiências tratando células inteiras com solução de KCl, durante uma hora, em duas concentrações: 0,01 e 0,001 N. Em todas as experiências realizadas, verificou-se que as células tratadas com sal potássico, perdem mais água, em relação ao peso inicial, do que célula controle. Todas as 8 células pré-tratadas com potássio se comportam

da mesma maneira: o  $K^+$  aumenta a permeabilidade das membranas, aumentando a transpiração dessas células, que passam a perder mais água do que as células controle. A figura Nº 9 ilustra uma curva obtida com êsse tratamento.

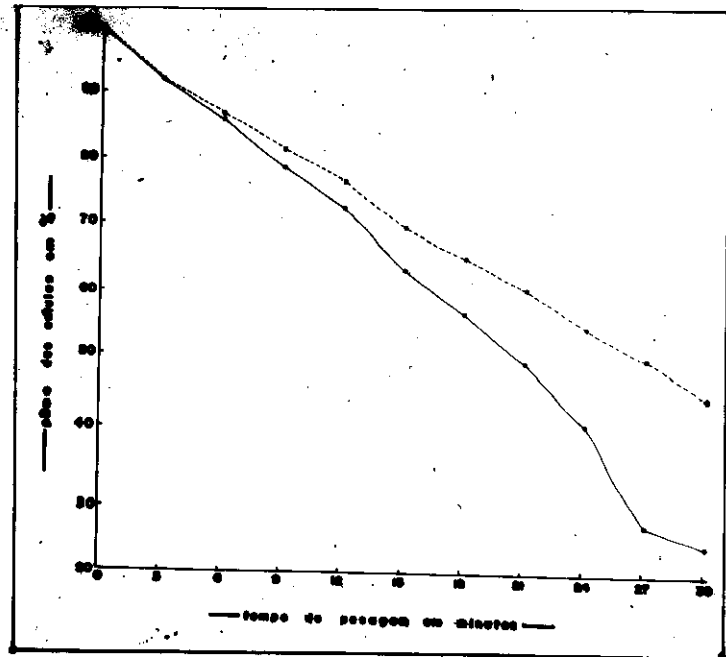


Figura Nº 9. Transpiração de uma célula tratada com KCl. Na comparação das curvas, observa-se - um aumento da transpiração causado pelo  $K^+$ .  
 Controle ----- KCl, 0,01N. UR= 45%.

T = 30 C.

Testou-se em seguida, o efeito do  $Ca^{++}$ : com pré-tratamento em solução de  $CaCl_2$ , 0,01 e 0,001 N, durante uma hora; notou-se um efeito contrário ao obtido com KCl. O  $Ca^{++}$  reduz a permeabilidade das membranas, diminuindo, de um modo geral, a transpiração em relação ao controle. As 18 experiências realizadas, apresentaram êsse resultado. A figura Nº 10 ilustra um resultado típico da série do pré-tratamento em solução de  $CaCl_2$ .

Pensou-se que o efeito se tornaria mais evidente com parando células tratadas com solução de KCl e células tratadas com solução de  $CaCl_2$ . A figura Nº 11 ilustra o resultado encontrado: o  $K^+$  aumentou e o  $Ca^{++}$  reduziu a perda de água, de modo que no final da pesagem, as curvas de transpiração obtidas ficam bem separadas, existindo entre elas uma diferença de 16,5% de perda no peso. Os efeitos antagônicos dos íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$  podem ser eliminados em muitos processos fisiológicos, quando os

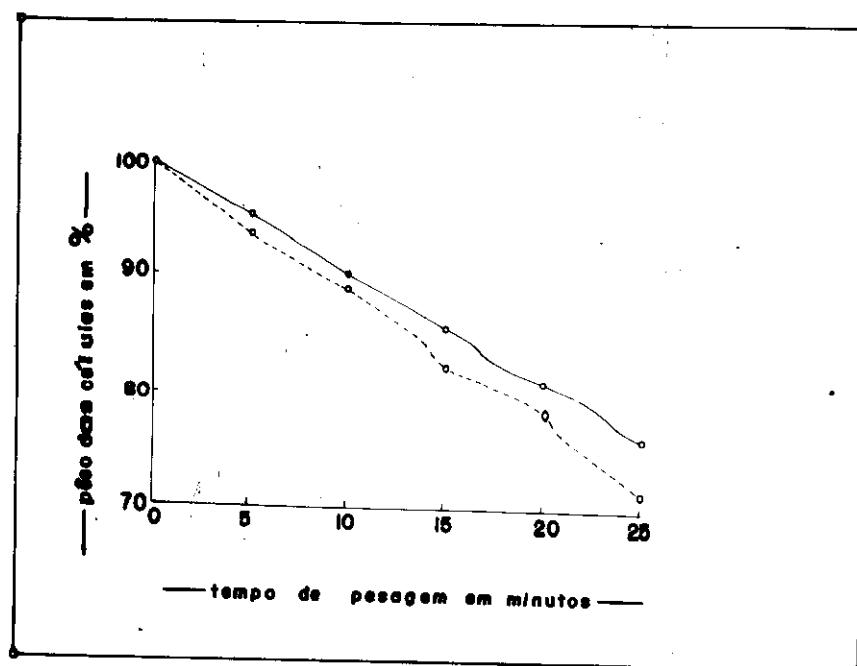


Figura Nº 10. Curva de transpiração de uma célula controle e uma célula tratada com  $\text{CaCl}_2$ . Houve diminuição da transpiração da célula tratada com  $\text{Ca}^{++}$ , em relação à célula controle. ----- Controle. - - - - -  $\text{CaCl}_2$ , 0,01 N. UR = 77%. T = 24 C.

sais são empregados, em certa proporção, juntos na solução. - Guttenberg e Baythien (1951), já observaram que uma mistura dos sais de  $\text{KCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ , não produz nenhum efeito sobre a permeabilidade.

O mesmo foi observado por nós, também relativamente a perda de água nas células de Nitella. Foi feita a comparação entre a célula controle e a célula tratada com mistura de soluções; foram preparadas soluções de  $\text{KCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ , ambas de concentração 0,01 N; dessas soluções misturou-se 2/3  $\text{KCl}$  com 1/3  $\text{CaCl}_2$ ; As células foram pré-tratadas com essa mistura durante 2 horas. As células assim tratadas apresentaram ainda, uma transpiração maior em relação a célula controle. Nessa proporção usada, o  $\text{Ca}^{++}$  ainda não compensou o efeito do  $\text{K}^+$  relativamente ao aumento da permeabilidade. Foi feita, em seguida, uma mistura dos dois sais já citados, proporções iguais e as células foram expostas a essa mistura. A figura Nº 12 ilustra o aumento da transpiração quando as células foram expostas a essa mistura. Inicialmente, prevalece o efeito do  $\text{Ca}^{++}$ , mas no fim de 10 minutos, as perdas do tratado e controle são iguais. As 10 experiências realizadas apresentaram esse resultado.



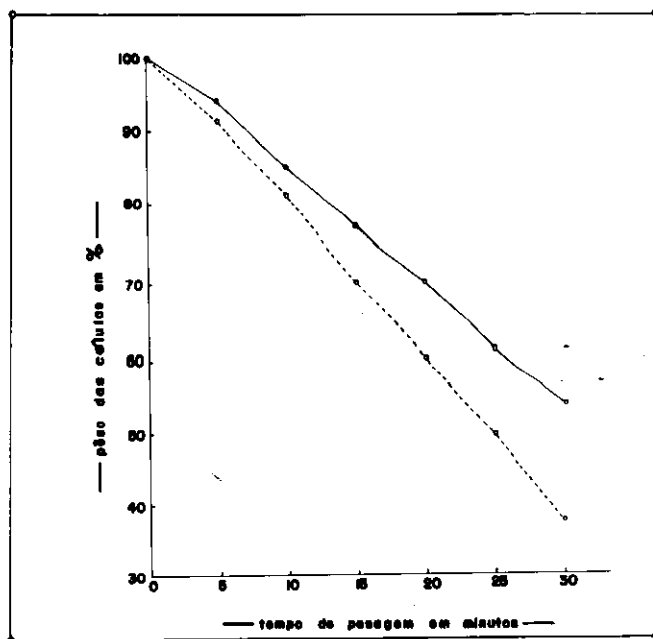


Figura Nº 11. Curva de transpiração de uma célula tratada com KCl e uma célula tratada com CaCl<sub>2</sub>. Comparando as curvas, observa-se que o efeito antagônico K<sup>+</sup> : Ca<sup>++</sup> é bem evidente. ----- CaCl<sub>2</sub>, 0,001 N. ————— KCl, 0,001 N. UR = 47%. T = 33,5 °C.

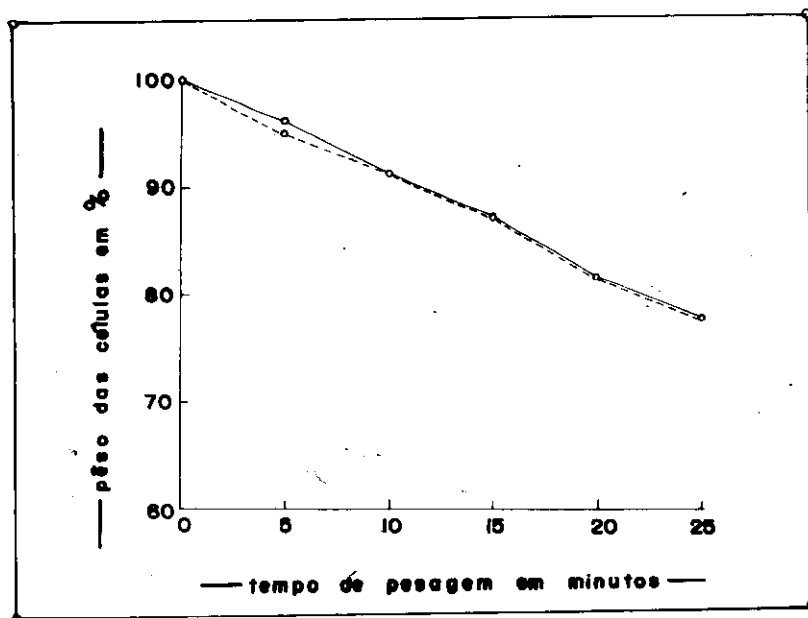


Figura Nº 12. Curva de transpiração de célula controle e célula tratada com a mistura 1/2 K<sup>+</sup> : 1/2 Ca<sup>++</sup>. As soluções de KCl e CaCl<sub>2</sub>, possuíam concentração 0,01 M. Observando as curvas, vê-se que as perdas do tratado e

contrôle são iguais. ----- Contrôle. ————— Mistu-  
ra 1/2 KCl: 1/2 CaCl<sub>2</sub>. UR = 58%, T = 17 °C.

As experiências realizadas demonstram que as células-  
tratadas com solução mista dos dois sais, aproximam-se muito ou  
coincidem com a curva de transpiração da célula controle.

Para comprovar, ainda mais, a importância da presença  
do Ca ++ na manutenção da permeabilidade regular da membrana, rea-  
lizamos a seguinte experiência: pré-tratamos células com um com-  
plexador de cátions plurivalentes, que dêsse modo retiraria o -  
Ca ++ da membrana. O quelador escolhido foi o EDTA; a solução -  
foi preparada do modo que foi exposto no capítulo anterior; a -  
concentração usada foi 0,0005 M. (Assim, células foram tratadas  
com solução de EDTA, durante 10 minutos e essas células foram -  
comparadas com células controle. Os resultados demonstram que a  
célula com uma quantidade reduzida de cálcio na sua superfície-  
pela ação do EDTA, perde mais água que o controle, (figura Nº 13).  
As 10 experiências apresentaram êsse resultado.

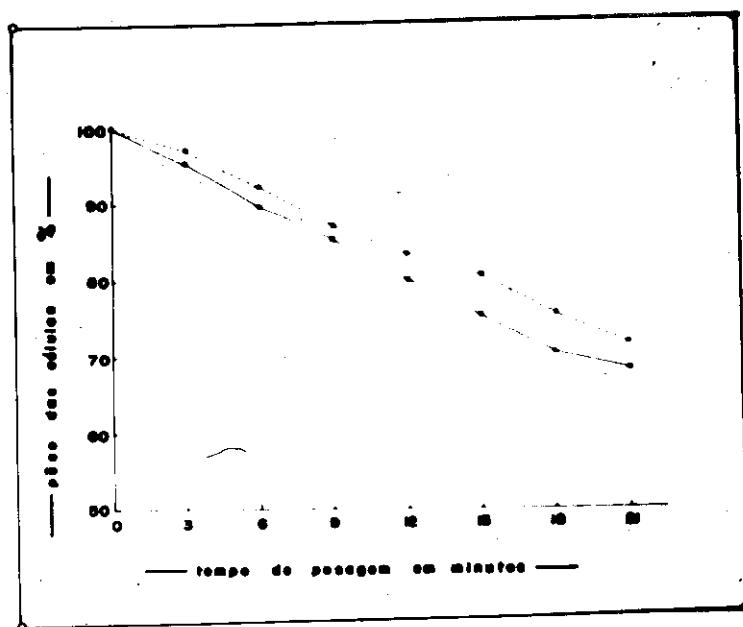


Figura Nº 13. Curva de transpiração de uma célula con-  
trôle e uma célula tratada com EDTA. O EDTA aumenta -  
a transpiração. ----- Contrôle ————— EDTA, 0,0005 M  
10 minutos. UR = 45%. T = 20 °C.

Posteriormente, realizamos experiências onde 2 célu-  
las foram pré-tratadas com solução 0,0005 M de EDTA, durante 10  
minutos; após, uma das células foi colocada em solução de KCl e  
a outra solução de CaCl<sub>2</sub>, ambas de concentração 0,01 N, e fica-

ram nessas soluções durante 2 horas. Os resultados obtidos das 8 experiências realizadas comprovam os anteriores:  $K^+$  aumentou e  $Ca^{++}$  diminuiu a transpiração (figura Nº 14). A diferença não é muito grande, pois o  $Ca^{++}$  complexado pelo EDTA é, sem dúvida, em parte substituído por  $K^+$  celular.

Num outro tipo de experiência, comparamos células tratadas com solução de  $CaCl_2$ , de concentração 0,001 N, durante 60 minutos, com célula tratada com solução 0,0005 M de EDTA, durante 10 minutos.

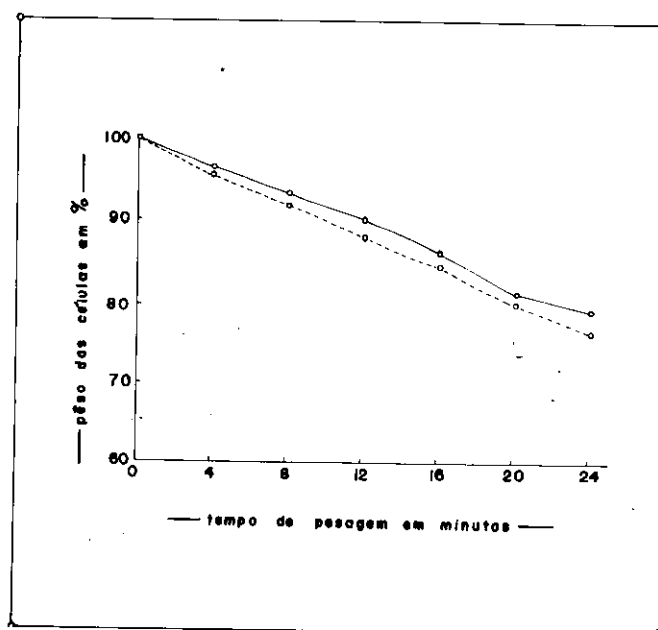


Figura Nº 14. Curva de transpiração de uma célula tratada com EDTA e após com  $K^+$ , e outra célula tratada com EDTA e posteriormente com  $Ca^{++}$ . Observa-se aumento da transpiração com  $K^+$  e diminuição com  $Ca^{++}$ .

----- EDTA - KCl. ----- EDTA -  $CaCl_2$ . UR = 51%. - T = 21,5 °C.

As células tratadas com EDTA perderam mais água que células tratadas com  $CaCl_2$  (figura Nº 15) As 10 experiências realizadas apresentaram esse resultado.

Para obtenção da média de valores de transpiração de células controle e células tratadas com KCl, foram realizadas 10 experiências. Os valores obtidos estão nas tabelas 3 e 4. A tabela 3 apresenta os valores de transpiração de células controle e a tabela 4 os valores de células tratadas com KCl. As experiências de mesmo número das duas tabelas, foram realizadas concomitantemente, em condições idênticas de T e UR. A comparação de  $\bar{X}$  dessas tabelas, mostra que células tratadas com -

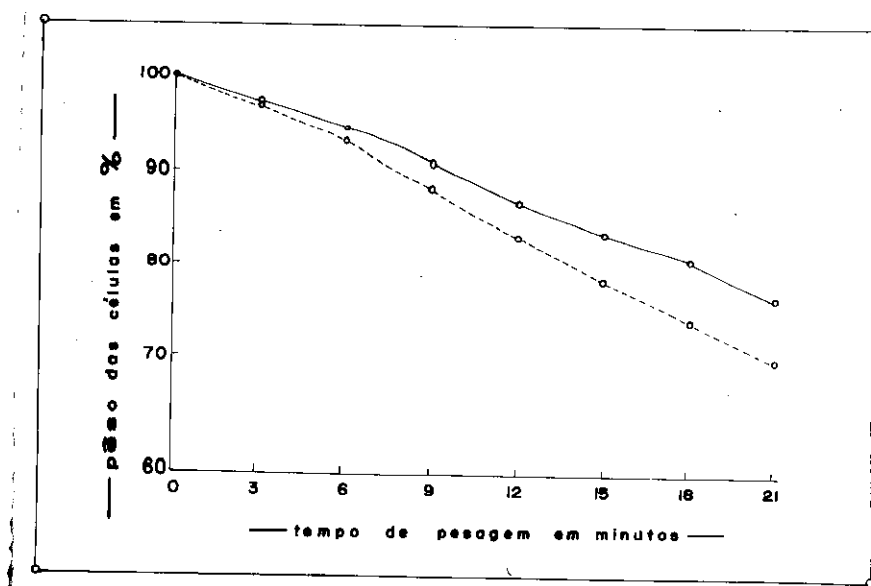


Figura Nº 15. Curva de transpiração de célula tratada com EDTA e célula tratada com  $\text{CaCl}_2$ . A célula tratada com EDTA perde mais água do que célula tratada com  $\text{CaCl}_2$ . ----- EDTA. ————  $\text{CaCl}_2$ . UP = 53%. T = 26 °C.

KCl perderam mais água do que célula controle e o valor dessa diferença no fim de 18 minutos é de  $75,43 - 70,27 = 5,16\%$ . Portanto 10 células tratadas com KCl perderam  $5,16\%$  a mais do seu peso do que as células controle. Os valores médios ( $\bar{X}$ ) dessas tabelas, foram usados na construção da figura Nº 16, que mostra de maneira mais compreensível, o resultado obtido. Esses valores são conclusivos e podemos afirmar que  $\text{K}^+$  aumenta a permeabilidade para a água da membrana citoplasmática, produzindo maior transpiração.

Repetimos esse método, para a obtenção da média de valores de transpiração comparada de célula controle e célula tratada com  $\text{CaCl}_2$ . Os valores de transpiração de 10 experiências são apresentados nas tabelas 5 e 6: a tabela 5 apresenta os valores de transpiração de células controle e a tabela 6 apresenta os valores das células tratadas com  $\text{CaCl}_2$ . Comparando  $\bar{X}$  dessas tabelas, verifica-se que células tratadas com  $\text{CaCl}_2$  perderam menos água do que células controle. No fim de 18 minutos a diferença é de:  $79,33 - 72,01\% = 7,32\%$ . Portanto as células tratadas com  $\text{CaCl}_2$ , perderam  $7,32\%$  a menos, do seu peso do que as células não tratadas. Os valores médios ( $\bar{X}$ ) dessas

Pêso da célula em %  
Contrôle

tempo de pes. em minutos	Exper. N°										$\bar{x}$	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	92,4	98,6	90,7	97,2	96,9	96,7	92,3	90,1	98,3	95,2	94,84	
6	87,4	97,2	82,9	94,3	95,3	95,8	87,5	85,2	96,9	94,3	91,68	
9	82,1	95,8	77,1	89,7	92,0	92,5	82,3	80,1	95,5	87,7	87,48	
12	77,0	94,4	68,1	88,1	90,3	91,0	77,4	76,1	94,1	86,1	84,26	
15	70,0	91,4	59,4	83,2	86,8	89,1	70,5	69,4	91,1	81,2	79,21	
18	66,0	89,1	49,8	79,8	85,0	86,3	66,4	65,3	88,8	77,8	75,43	

Tabela 3.

Valores de transpiração de célula controle. As experiências do mesmo número desta tabela e da tabela 4 foram realizadas simultaneamente, em condições idênticas de T e UR. Nas tabelas 3 e 4, os números indicam o pêso da célula em % considerando o pêso inicial igual a 100%.

$$\overline{UR} = 71\%.$$

$$\overline{T} = 20^{\circ}\text{C}.$$

KCl

Tempo de pes. em minutos	Exper. nº										$\bar{Y}$	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	91,7	97,2	91,1	96,0	96,1	96,4	91,5	89,9	96,9	94,0	94,08	
6	85,4	95,8	82,8	91,9	93,7	93,6	85,2	84,3	95,5	89,9	89,81	
9	78,7	92,9	73,8	89,1	91,2	91,5	78,0	76,5	92,6	87,1	85,14	
12	72,3	91,4	64,4	86,2	88,6	89,0	72,5	70,6	91,1	84,2	81,03	
15	62,9	89,9	52,8	83,2	84,2	84,5	62,5	61,2	89,6	81,2	75,20	
18	56,3	86,8	41,8	80,1	80,5	80,1	56,8	55,7	86,5	78,1	70,27	

Tabela 4.

Valores de transpiração de células tratadas com solução de KCl durante 2 horas.

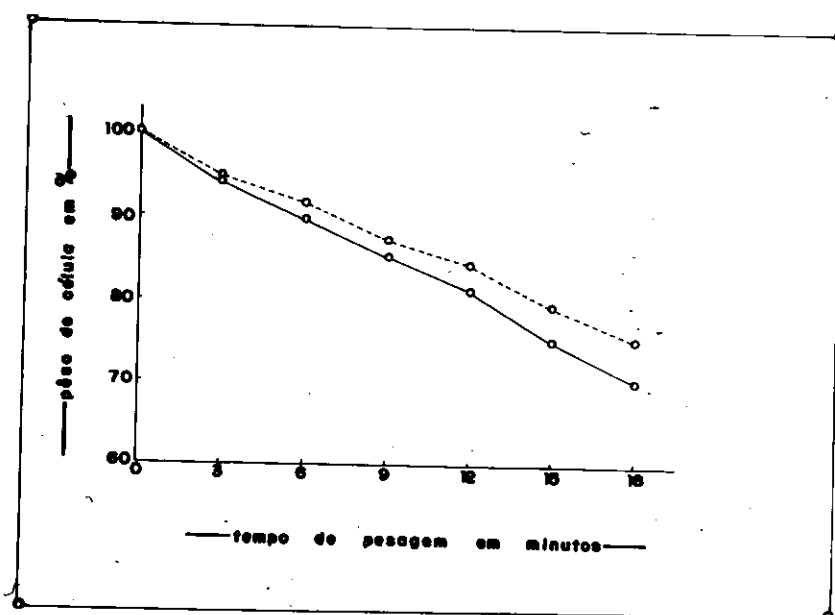


Figura Nº 16. Média da transpiração de célula controle e célula tratada com sal potássico. ----- Controle  
 ----- KCl, UR = 71 %, T = 20 °C.

tabelas foram usados na construção da figura Nº 17. As curvas apresentadas nessa figura, demonstram mais convincentemente o resultado obtido; a diminuição da permeabilidade para a água da membrana citoplasmática, acarretada pelo  $Ca^{++}$ , produzindo a diminuição de transpiração,

Podemos, portanto, concluir que a diferença média entre as células tratadas com KCl e com  $CaCl_2$  é da ordem de 12,48 %.

B. Discussão. Muitos trabalhos sobre a permeabilidade celular, mostram que a permeabilidade diferencial, que é um caráter essencial da célula viva, é localizada na superfície do citoplasma. Assim, Brooks (1940), observou que uma alta concentração de  $Na^+$  e  $K^+$  radioativo ocorreu no citoplasma de células de *Nitella*, consideravelmente antes de ter ocorrido no suco vacuolar. Höfler (1950) e Seeman (1953), sumarizaram considerável evidência, indicando que a camada inteira do citoplasma está envolvida na permeabilidade para a água. Estes resultados estão intimamente relacionados com os de Greenham (1966), que mediu a resistência elétrica do plasmalema e tonoplasto, e encontrou que a resistência do plasmalema é cinco vezes maior que a do tonoplasto e fala a favor da maior eficiência do plasmalema como barreira seletiva.

## Contrôle

Tempo de pes. em minutos	Exper. N <sup>o</sup>										$\bar{X}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	97,3	95,4	95,9	93,2	93,5	95,3	95,0	92,9	94,2	93,0	95,57
6	94,6	93,9	93,8	85,9	89,1	92,6	93,5	90,8	86,9	88,6	90,97
9	93,2	89,2	89,4	78,1	83,1	91,2	88,8	86,4	79,1	82,6	86,11
12	91,8	84,2	84,8	69,6	79,3	89,8	83,8	81,8	70,6	78,8	81,45
15	88,9	82,5	82,4	60,3	72,6	86,9	82,1	79,4	61,0	72,1	76,83
18	87,4	80,8	77,4	51,0	65,9	85,4	80,4	74,4	52,0	65,4	72,01

Tabela 5.

Valores de transpiração de células controle. As pesagens de mesmo número desta tabela e da tabela 6 foram realizadas simultaneamente, em condições idênticas de T e UR. Os números indicam o pêso de célula em %, considerando o pêso inicial igual a 100%

$\overline{UR} = 74\%$ .

$\overline{T} = 24,5^{\circ}\text{C}$ .



Pêso da célula em %  
CaCl<sub>2</sub>

Tempo de pes. em minutos	Exper. Nº.										$\bar{X}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	98,8	98,7	98,7	94,0	95,2	96,8	98,3	95,3	95,0	94,7	96,51
6	96,3	95,9	94,8	87,7	90,1	94,3	95,5	91,8	88,7	89,6	92,47
9	95,1	94,5	91,2	83,2	84,7	93,1	94,1	88,2	84,2	84,1	89,24
12	93,9	91,6	89,4	76,1	80,5	91,9	91,2	86,4	77,1	80,0	85,81
15	92,6	90,1	85,6	68,5	76,1	90,6	89,7	82,6	69,5	75,6	82,09
18	91,3	88,6	83,6	60,9	71,7	89,3	88,2	80,6	61,9	71,2	79,33

Tabela 6.

Valores de transpiração de células tratadas com solução CaCl<sub>2</sub>, durante 2 horas.

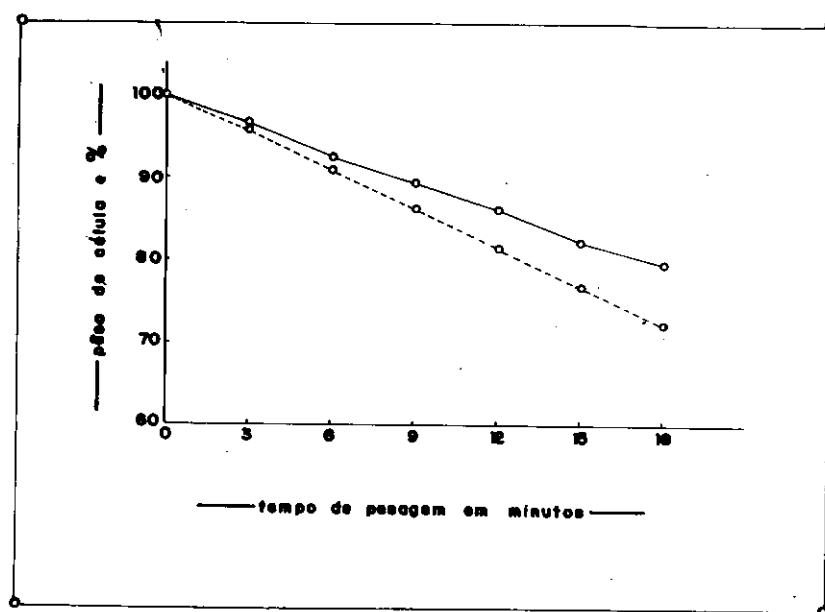


Figura Nº 17. Média da transpiração de célula controle e célula tratada com sal de  $\text{Ca}^{++}$ . ----- Controle  
 - - - - -  $\text{CaCl}_2$ . UR = 74 %. T = 24,5 °C.

É bem conhecido que a absorção de um íon particular é frequentemente afetado pela presença de outros íons, mas a maneira desta interação é complexa e difícil de resumir. Viets (1944) estudou o efeito do  $\text{Ca}^{++}$  sobre a absorção de  $\text{K}^+$  por pedaços de raízes de cevada. Ele relatou que a média de absorção de  $\text{KBr}$  por essas raízes é afetada pela concentração de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e outros íons polivalentes na concentração externa. Com aumento da concentração de  $\text{Ca}^{++}$ , superior a 0,1 N, a absorção de  $\text{K}^+$  foi grandemente acelerada, mais do que em solução faltando  $\text{Ca}^{++}$ . O efeito só é aparente, sob as condições de metabolismo aeróbico ("efeito Viets" 1944). Overstreet, Jacobson e Handley (1952), observaram que a troca de  $\text{K}^+$  absorvido com  $\text{K}^+$  ambiente é menor na presença de  $\text{Ca}^{++}$ , do que na sua ausência. Isto sugere que êsses íons, podem ter importantes efeitos, sobre a permeabilidade das membranas protoplasmáticas.

Os sais afetam a superfície do citoplasma, constituído pelo plasmalema, como se conhece de estudos plasmolíticos e eletrofisiológicos. É muito conhecido o antagonismo dos íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , relativamente a permeabilidade de células animais e vegetais. O  $\text{K}^+$  aumenta e o  $\text{Ca}^{++}$  diminui a permeabilidade para a água e substâncias dissolvidas, como se deduz de muitas pesquisas feitas com a técnica plasmolítica. Assim, True (1914),

e True Bartlett (1915, 1916), colocaram raízes de plantas em água destilada e observaram a saída de sais delas. Encontraram que esta saída foi prevenida por  $\text{Ca}^{++}$  e numa extensão menor por  $\text{Mg}^{++}$ , mas não por  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

Mais do que qualquer outro íon, o  $\text{Ca}^{++}$  é importante para a manutenção da permeabilidade regular do plasmalema. De acordo com Weber (1931), quando a célula é plasmolizada, um novo plasmalema é formado na superfície da célula murcha, pela "surface precipitation reaction". Se a plasmólise ocorre na ausência de  $\text{Ca}^{++}$  (devido a presença de oxalatos), a célula torna-se imediatamente muito mais permeável. De outro modo, se a plasmólise ocorre na presença de  $\text{Ca}^{++}$ , a permeabilidade da célula não parece ser grandemente alterada. O fato que a semipermeabilidade do plasmalema depende da presença do  $\text{Ca}^{++}$ , pode encontrar uma explicação no papel que este elemento desempenha na reação de precipitação superficial. Filmes produzidos nesta reação têm aparentemente as mesmas propriedades osmóticas como o plasmalema.

A alteração da membrana por  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$  é atribuído à hidratação dos colóides citoplasmáticos pelo  $\text{K}^+$  e desidratação pelo  $\text{Ca}^{++}$ . Kerr (1933), verificou que em pelos absorventes de Limnabium, o  $\text{NaCl}$  e o  $\text{KCl}$  provocam a liquefação do citoplasma e os bivalentes provocam uma solidificação do mesmo. Lunderger (1940), observou que o  $\text{K}^+$  diminui o potencial através da membrana protoplasmática para menos que 50 mv; um abaixamento de tal ordem torna o protoplasma mais líquido, intensificando a sua hidratação; o  $\text{Ca}^{++}$  e o  $\text{Mg}^{++}$  atuam em direção oposta, desidratando a membrana, e este processo aumenta a densidade, tensão superficial e estabilidade da membrana. Estes mesmos efeitos foram observados em células de Nitella (Osterhout, 1836; Auger, 1939), pela medição da resistência elétrica.

O efeito do  $\text{Ca}^{++}$  sobre a permeabilidade regular do plasmalema, tem sido estudado através de várias técnicas. Uma delas é a retirada do  $\text{Ca}^{++}$  ligado aos radicais da membrana, por meio de substâncias queladoras, como oxalatos, citratos, EDTA, etc. Assim, Herrman (1964), trabalhando com Allium cepa observou que tirando o  $\text{Ca}^{++}$  com oxalato, o plasmalema se dissolve com uréia; se o  $\text{Ca}^{++}$  está presente, uréia não dissolve o plasmalema. E o tratamento com EDTA provocou um aumento enorme da permeabilidade celular. Salton (1965), observou que o aumento da permeabilidade provocada pelo EDTA não é específica;

e que a saída do  $\text{Ca}^{++}$  produz uma substituição por íon, existente em excesso no ambiente. Já sabemos que Nitella, acumula  $\text{K}^+$  numa quantidade maior que 1000 vózes a existente no ambiente; - assim, o  $\text{K}^+$  substitui o  $\text{Ca}^{++}$ , aumentando a permeabilidade da célula; portanto, o efeito do EDTA é muito semelhante ao do  $\text{K}^+$ , e existem trabalhos que demonstram êsse fato. Assim, Hanson (1960), observou que KCl e EDTA aumentam a permeabilidade da membrana superficial do citoplasma de células de levedura, de tal modo que saem nucleótídeos da célula; e o EDTA causa também a saída de  $\text{K}^+$  da célula.

De acôrdo com a teoria de Danielli, a membrana citoplasmática consiste de duas camadas monomoleculares de lipídeos; as moléculas de lipídeos podem se dissociar, ficando negativo no seu grupo polar; êstes podem ser alterados antagônicamente por cátions mono e divalentes; as cefalinas e lecitinas, acham se ligadas a cátions, formando um sal; êstes sais de  $\text{K}^+$  são relativamente solúveis quando comparados com os de  $\text{Ca}^{++}$  ou o sal de  $\text{Ca}^{++}$  é relativamente mais hidrófobo do que o sal de  $\text{K}^+$ .

Concluimos, portanto, que o  $\text{K}^+$  aumenta e o  $\text{Ca}^{++}$  reduz a permeabilidade para a água, da membrana superficial do citoplasma, acarretando maior ou menor transpiração. É de supor que êste efeito básico ocorra também nas células das fôlhas da planta superior onde pode ter um resultado inverso, devido ao mecanismo das células estomáticas, que reduzindo a sua permeabilidade para a água, pela ação do  $\text{Ca}^{++}$ , tornam-se mais túrgidas e abrem os poros.

Assim, foi demonstrado, pela primeira vêz, que a transpiração de uma célula isolada pode ser alterada pela modificação da resistência que o plasmalema oferece à passagem de  $\text{H}_2\text{O}$ . As alterações induzidas pelo  $\text{Ca}^{++}$  e por  $\text{K}^+$ , devem ser muito grandes, de modo que se manifestam diante das fôrças de centenas de atmosferas do potencial de  $\text{H}_2\text{O}$  de célula e ambiente, pois a umidade relativa de 70% equivale a uma força de ca 500 atmosferas.

É muito improvável que as resistências surjam na membrana inerte, devido a uma desidratação da mesma. Os êfeitos antagônicos dos íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$  sôbre a transpiração de uma célula isolada de Nitella, se manifestam no:

1. Aumento da resistência do plasmalema à passagem da água, causada pelo  $\text{Ca}^{++}$ ; conseqüentemente, diminui a transpiração.

2. Diminuição da resistência do plasmalema à passagem da água, causada pelo  $K^+$ ; em consequência, aumenta a transpiração.

3. Os efeitos acima citados, não ocorrem quando a célula é exposta a uma mistura de  $K^+ : Ca^{++}$ , em proporções iguais.

4. O EDTA, que retira o  $Ca^{++}$  da membrana, produz um efeito igual ao  $K^+$ ; aumenta a perda de água por transpiração.

5. Comparando célula jovem com célula adulta, ambas não tratadas, observa-se que a célula jovem transpira mais do que a célula adulta. Uma das causas prováveis é a exposição mais longa ao  $Ca^{++}$  do ambiente, sofrida pela célula adulta.

## 2. O efeito do IAA.

Os resultados discutidos no capítulo anterior demonstraram o efeito do  $Ca^{++}$  no sentido de aumentar a resistência à difusão da água, e consequentemente, a transpiração. Observamos o efeito quelante do EDTA, retirando o  $Ca^{++}$  e aumentando a permeabilidade das membranas consideradas vivas da célula. Efeito muito semelhante poderá ser obtido com IAA, que também tem efeito quelante, segundo a hipótese de Bennet-Clark (1956), retirando o  $Ca^{++}$  das suas ligações na membrana; pode-se assim imaginar que a retirada de  $Ca^{++}$  deveria acarretar o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, e portanto da transpiração. Estudos da ação do IAA sobre a transpiração de células isoladas não se encontram na bibliografia.

### a. IAA.

A auxina escolhida foi ácido  $\beta$ -indol acético ou IAA ou heteroauxina de fórmula  $C_{10}H_9NO_2$ . É insolúvel em água e clorofórmio e solúvel em álcool, acetona e éter. Em solução, a inativação é muito rápida, e mudanças razoáveis são observadas em 10 dias, mesmo sob as condições de refrigeração, (Leopold, 1955). Por esta razão, não foram usadas soluções estoque de IAA, com mais de uma semana.

No preparo das soluções, foram usadas algumas gotas de álcool etílico 99,8 % para solubilizar o ácido; o volume foi completado com água destilada. A estocagem foi feita em condições de refrigeração. A solução empregada foi 0,005 % e apresentou um pH entre 5 e 6.

Efetou-se a comparação simultânea entre duas células isoladas: uma célula controle (que ficava em água), e a outra tratada com solução de IAA, 0,005 %, durante 10 minutos.

b. Resultados:

Nestas experiências, relacionamos a perda de água (mg) com a unidade da superfície celular ( $\text{cm}^2$ ).

Na comparação entre células controle e célula tratada, verificou-se que nos 3 primeiros minutos as células tratadas perderam mais água do que as células controle (numa análise de 20 pesagens). Os valores dados estão nas tabelas 7 e 8. A tabela 7 mostra os valores obtidos para as células controle (sem tratamento) e a tabela 8 mostra os valores obtidos para as células que sofreram tratamento com IAA.

Os valores médios para cada intervalo de tempo, das tabelas 7 e 8, foram usados para construir a figura Nº 13. O percurso geral das curvas, por exemplo o valor mínimo após 9 minutos e o máximo no fim de 12 minutos, é devido às alterações da umidade e temperatura que afetam as condições gerais da transpiração. Nesta figura, observa-se melhor a diferença existente na transpiração, de célula controle e tratada, nos 3 primeiros minutos de pesagem.

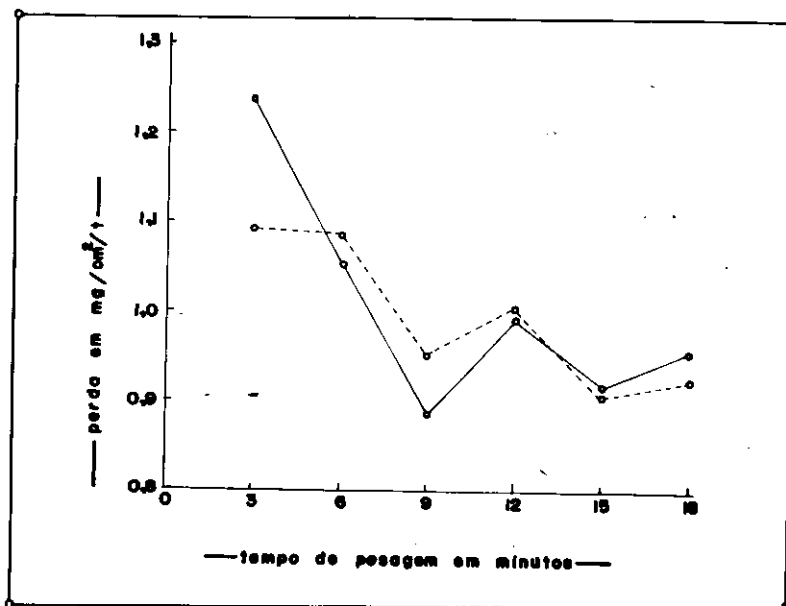


Figura Nº 13. Curva de transpiração de células isoladas de Nitella cernua Braun: comparação de célula controle com célula tratada. Nos 3 primeiros minutos, o IAA aumentou a permeabilidade para a água. ----- Controle. ————— Célula tratada com IAA, durante 10 min. UR = 68,6%. T = 21,2 °C.

N <sup>o</sup> da exper.	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /intervalo de tempo (3 minutos)					
	3	6	9	12	15	18
1	0,47	0,76	0,76	0,76	0,47	0,66
2	0,97	1,15	0,77	0,77	0,77	0,77
3	0,84	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
4	0,96	0,96	0,96	0,72	0,96	0,72
5	1,24	0,50	0,75	1,01	0,50	0,50
6	1,30	1,03	1,30	1,30	1,03	1,30
7	1,20	1,80	1,20	0,60	1,20	1,20
8	1,32	1,32	0,66	1,32	0,66	0,99
9	1,13	1,70	1,13	1,13	1,13	1,70
10	1,27	0,85	0,85	1,25	0,85	0,85
11	0,74	1,74	1,49	0,99	1,24	0,74
12	1,42	0,85	0,85	1,42	1,13	0,85
13	1,64	1,64	1,09	1,37	1,37	0,82
14	1,42	0,71	0,71	0,95	0,95	0,47
15	1,36	1,81	1,13	1,54	0,90	1,36
16	0,53	0,79	0,94	0,79	0,79	1,10
17	0,70	0,70	0,88	0,88	0,88	0,70
18	0,71	0,71	0,85	0,56	0,85	0,56
19	1,62	1,13	0,97	0,97	1,13	1,46
20	0,83	0,88	1,10	1,10	0,66	1,10
Média	1,092	1,086	1,954	1,006	0,908	0,927

Tabela 7.

Valores de transpiração de células controle, isoladas de *Nitella cernua* Braun.

$$\bar{U}_R = 68,6 \%$$

$$\bar{T} = 21,2 \text{ } ^\circ\text{C.}$$

Nº da exper.	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /intervalo de tempo					
	3	6	9	12	15	18
1	0,51	0,82	0,61	0,82	0,51	0,61
2	1,17	1,17	0,78	0,78	0,78	0,78
3	1,70	0,43	0,86	0,64	1,08	1,08
4	0,92	0,61	0,92	0,61	0,92	0,61
5	1,08	0,72	0,36	0,54	0,54	0,54
6	1,76	1,06	1,41	1,41	1,41	1,41
7	1,39	1,67	1,11	0,83	1,11	1,39
8	1,67	1,11	0,83	0,83	0,55	1,39
9	1,08	1,80	0,36	1,44	1,08	1,44
10	1,06	0,81	0,81	1,08	0,81	0,81
11	0,95	1,34	1,34	1,13	1,13	0,75
12	1,13	0,85	1,13	1,13	1,13	0,85
13	1,50	1,50	1,20	1,20	0,90	0,90
14	1,17	1,17	0,88	0,88	1,17	0,58
15	1,67	1,67	1,25	1,67	1,04	1,25
16	0,83	0,83	0,55	0,69	0,69	0,83
17	1,32	0,66	0,88	1,10	0,66	0,88
18	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
19	1,94	1,16	1,16	1,35	1,16	1,57
20	1,29	1,07	0,86	1,07	1,07	0,86
Média	1,239	1,054	0,887	0,992	0,919	0,959

Tabela 8.

Valores de transpiração de células isoladas de *Nitella cernua* Braun, tratadas com IAA, durante 10 minutos.

UH = 68,6%.

T = 21,2 °C.



Comparando o valor médio, dos três primeiros minutos da tabela 7, com o valor médio dos 3 primeiros minutos da tabela 8 encontra-se uma diferença de 0,147 mg a mais de perda de água, para as células tratadas com IAA. Como este valor é alto, foi feito um teste para provar a sua significância.

Teste de t:

Nº da exper.	A		B		$x^2$ 1
	Contrôle	IAA	B - A		
1	0,47	0,51	0,05	0,0016	
2	0,97	1,17	0,20	0,0400	
3	0,84	1,70	0,86	0,7396	
4	0,96	0,92	-0,04	0,0016	
5	1,26	1,08	-0,18	0,0324	
6	1,30	1,76	0,46	0,2126	
7	1,20	1,39	0,19	0,0361	
8	1,32	1,67	0,35	0,1225	
9	1,13	1,08	-0,05	0,0025	
10	1,27	1,06	-0,21	0,0441	
11	0,74	0,95	0,21	0,0441	
12	1,42	1,13	0,29	0,0841	
13	1,64	1,50	-0,14	0,0196	
14	1,42	1,17	-0,25	0,0625	
15	1,36	1,67	0,31	0,0961	
16	0,63	0,83	0,20	0,0400	
17	0,70	1,32	0,62	0,3844	
18	0,32	0,65	0,06	0,0036	
19	1,62	1,94	0,32	0,1024	
20	0,88	1,29	0,41	0,1681	

$$\Sigma = 2,95 \quad 2,2379$$

$$\frac{2,95}{20} = 0,147.$$

$$\begin{array}{rcl} \sum x_1^2 = 2,2379 & \sum x_1^2 & = 2,2379 \\ \sum (x_1)^2/n = 0,4351 & \sum (x_1)^2/n & = 0,4351 \\ \hline \sum (x_1 - \bar{x})^2 = 1,8028 & & \end{array}$$

$$\frac{1,8028}{19} = 0,0948$$

$$0,0948 = 0,307$$

$$t = \frac{0,147 - 0}{0,307} = 9,8$$

Contrasta com um  $t$  ( 91; 0,05 ) = 1,729.

Como o  $t$  calculado é maior do que o  $t$  da tabela, concluímos que os 3 primeiros minutos de pesagem houve um aumento da permeabilidade das células tratadas, devido ao IAA.

Pensou-se, então, que o efeito do IAA no sentido de aumentar a permeabilidade pudesse ser revertido com pós-tratamento com cátion bivalente. Apoiado nessa hipótese, o método foi repetido, da seguinte maneira: uma célula ficava em água durante 30 minutos (célula controle); a outra, ficava em solução de IAA durante 10 minutos, e depois colocada em  $\text{CaCl}_2$ , 0,001 M, durante 20 minutos (célula tratada). Após o tratamento, ambas as células foram retiradas, enxugadas cuidadosamente com papel de filtro e pesadas. Os resultados obtidos estão nas tabelas 9 e 10: a tabela 9 têm valores obtidos das células controle, e a tabela 10 apresenta os valores obtidos das células tratadas. Os valores médios foram usados para construir a figura nº 19. Verificou-se que o tratamento posterior com  $\text{CaCl}_2$ , na concentração e tempo de tratamento usados, não reverteu o fenômeno provocado pelo IAA. Resolveu-se tratar a reversão do fenômeno provocado pelo IAA com outro método mais sensível. Isso foi feito através da medição direta do fluxo de líquido, como sera relatado em capítulo posterior.

Em seguida estudou-se o fator tempo no efeito do IAA sobre a transpiração. Desta maneira foi feito tratamento de células com solução  $10^{-3}$  M de IAA, em tempo variado de modo que houvesse uma exposição extremamente curta, outra relativamente longa e alguns valores intermediários: a exposição mais curta foi de 30 segundos e a mais longa foi de 16 minutos, e os tempos in-

Nº da exper.	Perda em mg/cm <sup>2</sup> / intervalo de tempo					
	3	6	9	12	15	18
1	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28
2	1,41	1,41	1,20	1,20	1,20	1,20
3	1,81	2,81	1,27	2,18	1,27	1,81
4	2,21	1,65	2,48	1,10	1,65	1,65
5	2,04	0,58	1,75	0,58	2,33	1,45
6	1,77	0,88	1,99	1,11	1,55	1,55
7	1,67	1,67	1,91	1,43	1,67	1,67
8	1,10	1,66	1,10	1,66	1,66	1,66
9	0,72	1,62	1,26	0,90	1,80	1,08
10	1,14	1,60	0,90	1,14	1,80	0,68
11	1,02	1,44	0,61	1,44	1,23	0,82
12	1,71	0,97	1,22	0,97	1,22	1,22
13	1,06	1,32	1,32	1,59	1,91	1,06
14	0,78	1,57	1,17	1,17	1,57	0,98
15	1,55	1,55	1,55	2,33	1,55	1,81
16	1,84	1,84	1,22	1,84	1,53	1,53
17	1,18	1,42	1,18	1,42	1,42	0,95
18	1,43	2,01	1,43	1,14	1,72	1,43
19	1,48	1,48	1,48	0,99	1,73	1,24
20	1,52	0,65	1,74	1,08	1,30	1,30
Média	1,436	1,439	1,403	1,327	1,569	1,318

Tabela 9.  
Valores de transpiração de células isoladas de Nitella cernua Braun.

$\overline{UR} = 54,9 \%$ .

$\overline{T} = 22,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Nº da exper.	Perda em mg/cm <sup>2</sup> / intervalo de tempo					
	3	6	9	12	15	18
1	1,23	1,23	1,23	1,23	1,84	1,23
2	1,38	1,58	1,38	1,78	0,99	1,38
3	2,14	2,14	1,50	2,57	1,07	2,36
4	2,43	1,62	2,16	1,35	2,16	1,62
5	2,19	1,39	1,64	0,82	1,64	1,64
6	2,17	0,48	2,66	1,21	1,93	1,69
7	1,65	1,65	1,65	1,44	1,65	1,44
8	1,58	1,84	2,05	2,10	1,58	1,58
9	0,84	1,01	1,51	1,33	1,68	1,17
10	1,05	1,89	1,05	1,26	1,47	0,84
11	1,70	1,48	1,06	1,48	1,48	0,63
12	1,87	0,93	1,40	0,93	1,17	1,40
13	1,47	0,88	1,18	1,47	1,47	1,47
14	0,94	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32
15	1,91	1,91	1,91	2,15	1,67	2,15
16	1,98	1,69	1,13	1,98	1,69	1,98
17	1,19	1,43	1,43	1,19	1,43	1,43
18	1,21	1,61	0,80	0,80	1,21	1,41
19	1,40	1,68	1,12	1,40	1,96	1,40
20	1,53	0,79	1,38	1,23	0,92	1,07
Média	1,593	1,412	1,428	1,452	1,516	1,460

Tabela 10.  
Valores de transpiração de células tratadas 10 minutos com IAA 0,005% e pós-tratamento com CaCl<sub>2</sub> 0,001 M, durante 20 minutos.

UR = 54,9%.

T = 22,5 °C.

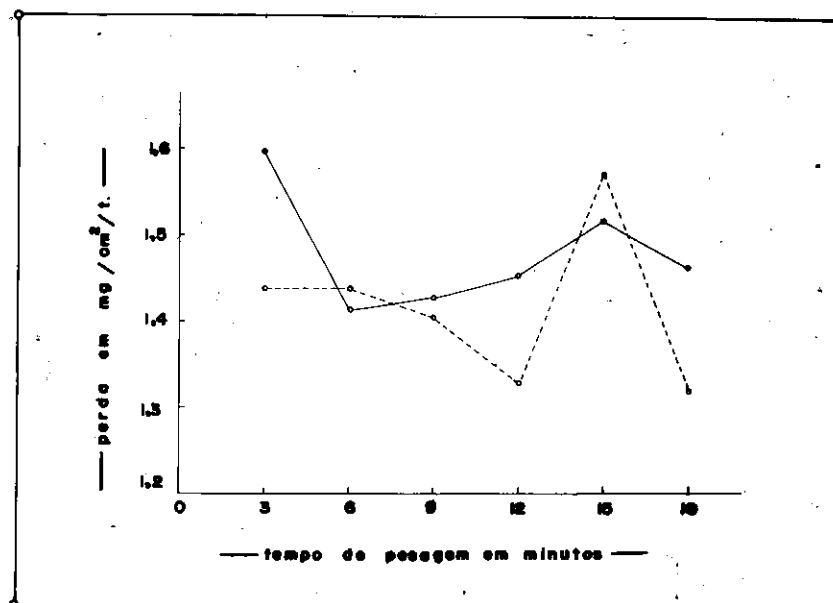


Figura nº 19. Curva da transpiração de células isoladas de *Nitella*: comparação de célula controle com célula tratada primeiro com IAA e de pois com Ca. O resultado obtido demonstra que o efeito do IAA no sentido de aumentar a permeabilidade não foi revertido por Ca com 20 minutos de tratamento. --- Controle. — IAA + Ca. UR = 54,9%. T = 22,5°C.

intermediários foram 1, 4, 5, 6, 7 e 8 minutos; em todos os casos comparou-se a transpiração de célula controle com célula tratada. O resultado obtido foi o seguinte: o aumento da exposição à solução de IAA provoca aumento da transpiração. O efeito é bem evidente; as células que sofreram exposição durante pouco tempo transpiraram menos que o controle. Os resultados são apresentados em tabelas e gráficos; para cada tratamento há 2 tabelas e 2 gráficos: uma tabela apresenta a perda por transpiração em  $\text{mg}/\text{cm}^2/\text{t}$  e a outra a perda acumulada em  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , ambas num período de 18 minutos. Para cada tabela há um gráfico correspondente. As células que foram expostas durante 30 segundos 1, 4 e 5 minutos transpiraram menos que o controle (fig. 20a, 21a, 22a e 23a). A célula que foi exposta durante 6 minutos já apresentou uma transpiração maior do que o controle (fig. 24a), e o mesmo se observou em relação as exposições de 7, 8, 10 e 16 minutos (fig. 25a, 26a, 27a e 28a). As curvas de andamento da transpiração (fig. 20 a 28) mostram que tanto o controle como o tratado com IAA deram um percurso geral das curvas muito semelhante, porém ambas apresentam amplas variações que podem ser atribuídas a pequenas oscilações dos fatores, não acusados pelos instrumentos de medição que afetam a transpiração de uma maneira geral. Nas figuras a correspondentes, observa-se claramente que o aumento do tempo de exposição acarreta o aumento da permeabilidade.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.	
	Contrôle	Tratado
3	1,09	0,70
6	1,63	1,57
9	1,27	1,22
12	1,45	1,40
15	1,45	1,05
18	1,45	1,75

Tabela 11. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA,  $10^{-3}$  M, durante 30 segundos.  
UR = 63 %. T = 19,4 °C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	1,09	0,70
6	2,72	2,27
9	3,99	3,49
12	5,44	4,89
15	6,89	5,94
18	8,34	7,69

Tabela 11<sup>a</sup>. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de Nitella, de acordo com a tabela acima.

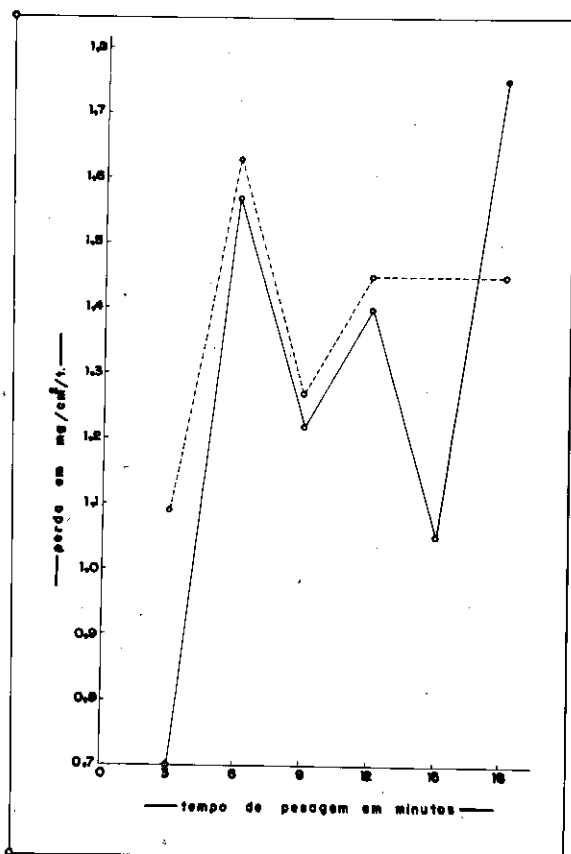


Figura Nº 20. Curva de transpiração de célula controle e célula tratada com IAA, durante 30 segundos.

..... Controle UR = 63%  
 — IAA, 10<sup>-3</sup> M, 30 seg. T = 19,4°C.

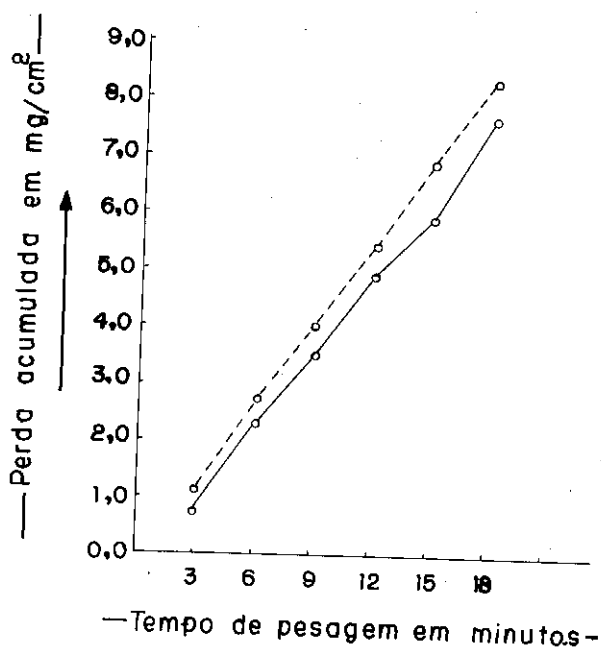


Figura Nº 20a. Curvas de transpiração, de acordo com os valores acumulados da tabela IIa.

..... Controle. — IAA.

Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.		
Min. de pesagem	Contrôle	Tratado
3	1,68	1,30
6	1,68	1,49
9	1,05	1,12
12	1,68	1,30
15	1,47	1,12
18	1,26	1,30

Tabela 12. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle - com célula tratada com IAA,  $10^{-3}$  M, durante 1 minuto.

UR = 59 %.

T = 18,3 °C.

Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .		
Min. de pesagem	Contrôle	Tratado
3	1,68	1,30
6	2,36	2,79
9	3,41	3,91
12	5,09	5,21
15	6,56	6,33
18	7,82	7,63

Tabela 12<sup>a</sup>. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de Nitella, de acordo com a tabela acima.



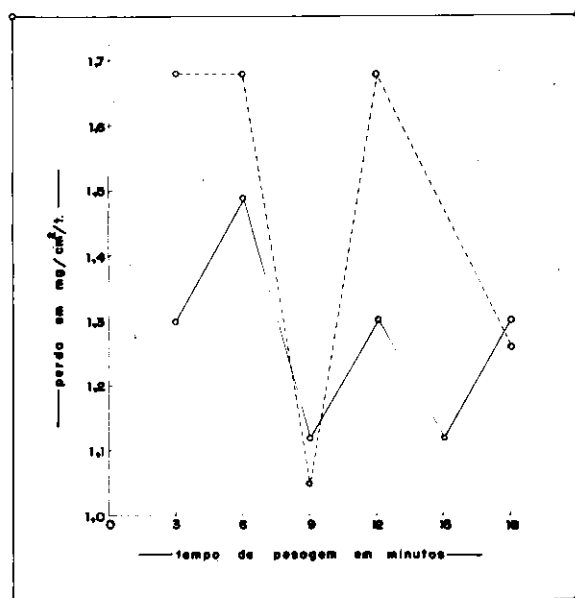


Figura Nº 21. Andamento da transpiração de célula -  
 controle e célula tratada com IAA, durante 1 minuto.

----- Controle, UR = 59%.  
 — IAA, 10<sup>-3</sup> M, 1 minuto. T = 18,3 °C.

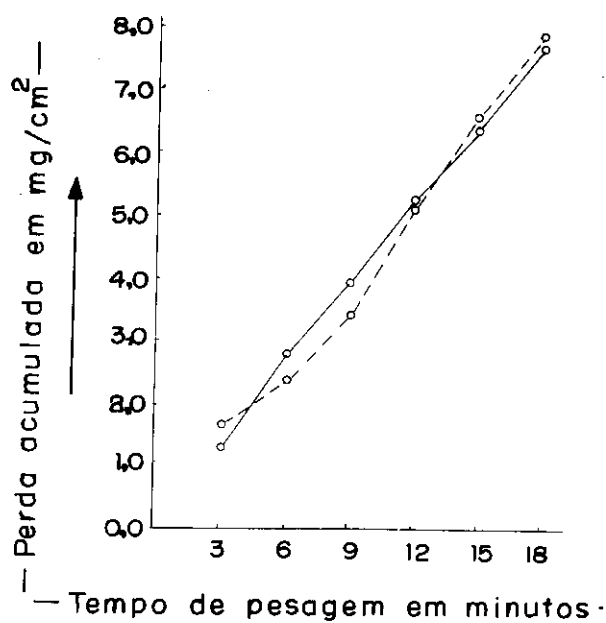


Figura Nº 21a. Curvas de transpiração, de acordo -  
 com os valores da tabela 12ª.

----- Controle. — IAA.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.	
	Contrôle	Tratado
3	2,01	1,19
6	1,78	1,79
9	1,56	1,39
12	1,56	1,59
15	1,56	1,19
18	1,56	1,59

Tabela 13. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA,  $10^{-3}$  M, durante 4 minutos.  
UR = 54 %. T = 21 °C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	2,01	1,19
6	3,79	2,98
9	5,35	4,37
12	6,91	5,96
15	8,47	7,15
18	10,03	8,74

Tabela 13<sup>a</sup>. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de Nitella, de acordo com a tabela acima.

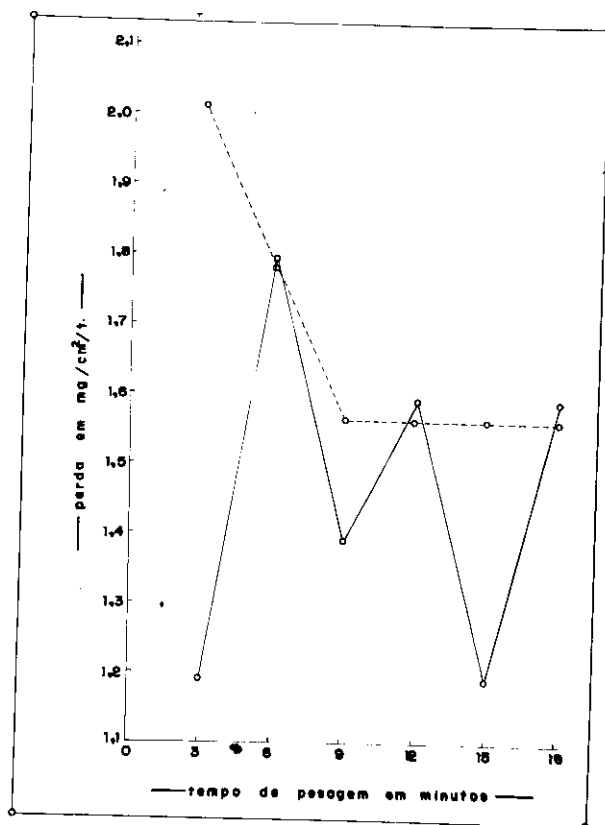


Figura Nº 22. Andamento da transpiração de célula controle e célula tratada com IAA, durante 4 minutos.

----- Controle. UR = 54%.  
 ----- IAA,  $10^{-3}$  M, 4 minutos. T = 21 °C.

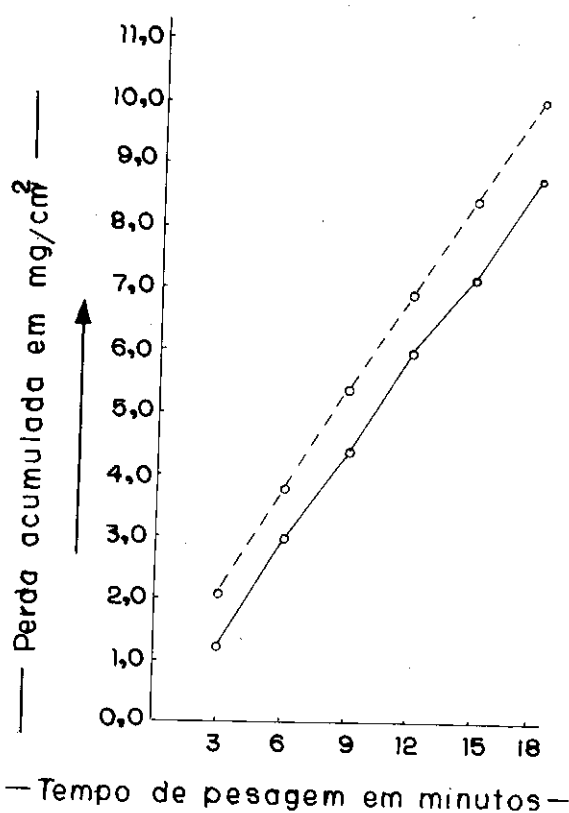


Figura Nº 22ª. Curvas de transpiração de acordo com os valores acumulados da tabela 13ª.  
 ----- Controle. ----- IAA.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.	
	Contrôle	Tratado
3	1,63	1,59
6	1,86	1,59
9	1,63	1,59
12	2,09	2,12
15	1,39	1,33
18	1,86	1,59

Tabela 14. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup> M, durante 5 minutos.  
UR = 54 %. T = 21,5 °C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	1,63	1,59
6	3,49	3,18
9	5,12	4,77
12	7,21	6,89
15	8,60	8,22
18	10,46	9,81

Tabela 14<sup>a</sup>. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de Nitella, de acôrdo com a tabela-acima.

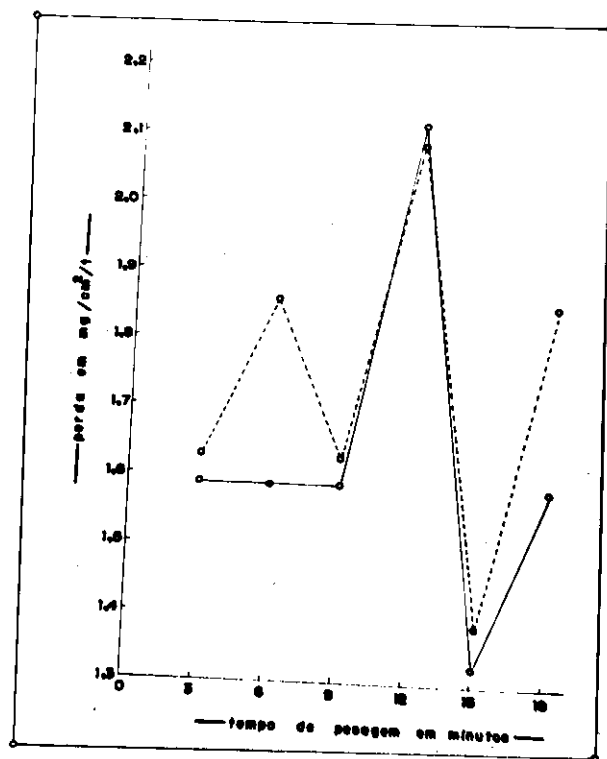


Figura Nº 23. Andamento da transpiração de célula - controle e célula tratada com IAA, durante 5 minutos.

----- Controle. UR = 54%.  
 — IAA, 10<sup>-3</sup> M, 5 minutos. T = 21,5 °C.

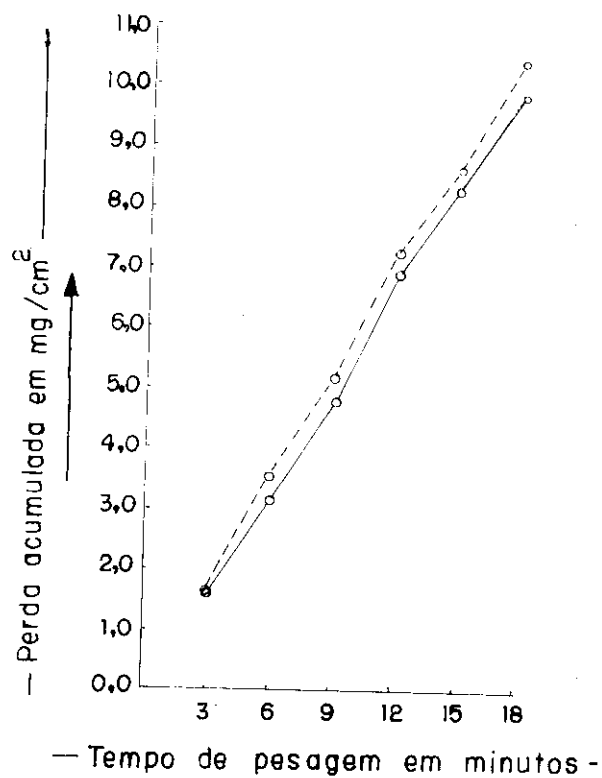


Figura Nº 23ª. Curvas de transpiração, de acordo com os valores da tabela 14ª.

----- Contrôlo. — IAA.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.	
	Contrôle	Tratado
3	1,43	1,86
6	1,67	1,63
9	1,67	1,63
12	0,95	0,93
15	1,19	1,39
18	1,19	1,16

Tabela 15. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de Célula com controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup>M, durante 6 minutos.

UR = 60%.

T = 20,6°C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	1,43	1,86
6	3,10	3,49
9	4,77	5,12
12	5,72	6,05
15	6,91	7,44
18	8,10	8,60

Tabela 15a. Valores cumulativos de transpiração de células isoladas de Nitella, de acordo com a tabela acima.

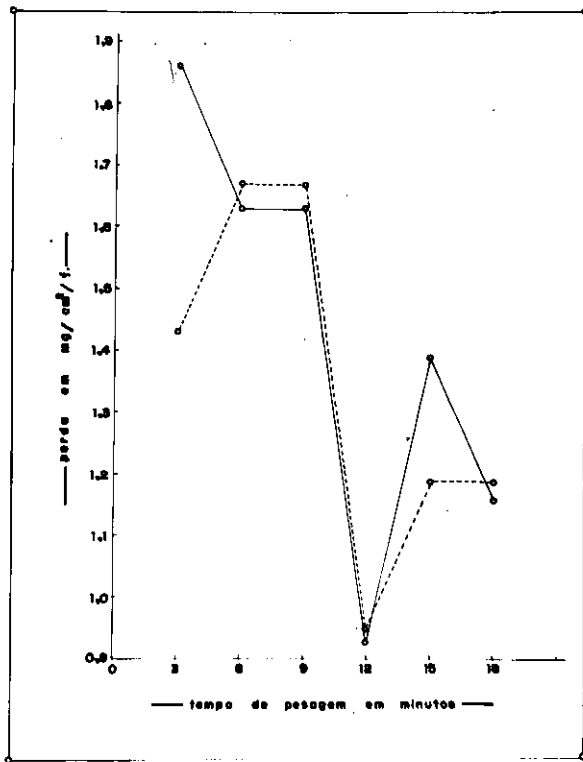


Figura Nº 24. Andamento da transpiração de célula controle e célula tratada com IAA, durante 6 minutos.

----- Controlê. UR = 60%.  
 ————— IAA, 10<sup>-3</sup> M, 6 minutos. T = 20,6 °C.

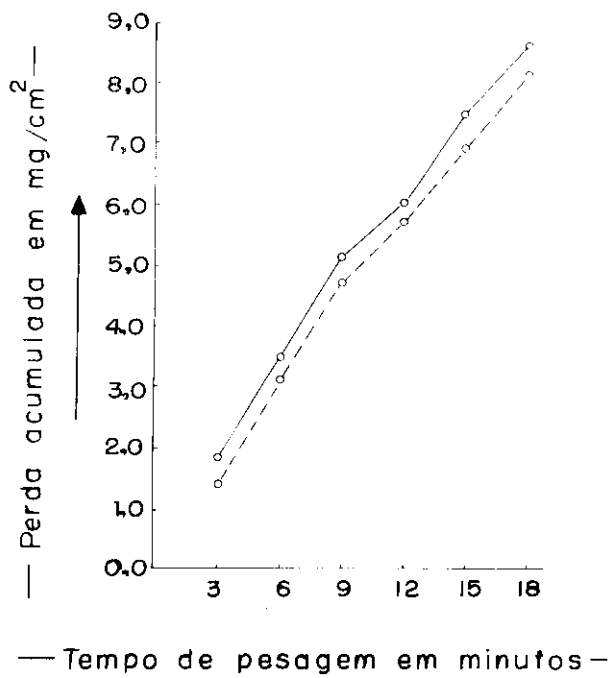


Figura Nº 24a. Curvas de transpiração de acôrdo com os valores da tabela 15a.

----- Controlê. ————— IAA.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo	
	Contrôle	Tratado
3	1,33	1,61
6	1,33	1,21
9	1,33	1,61
12	1,33	1,61
15	1,77	1,61
18	0,89	1,21

Tabela 16. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula com controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup>M, durante 7 minutos.

UR = 60%.

T = 21°C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup>	
	Contrôle	Tratada
3	1,33	1,61
6	2,66	2,82
9	3,99	4,43
12	5,32	6,04
15	7,09	7,65
18	7,98	8,86

Tabela 16 a -Valores cumulativos de transpiração de células de Nitella, isoladas, de acordo com a tabela acima.



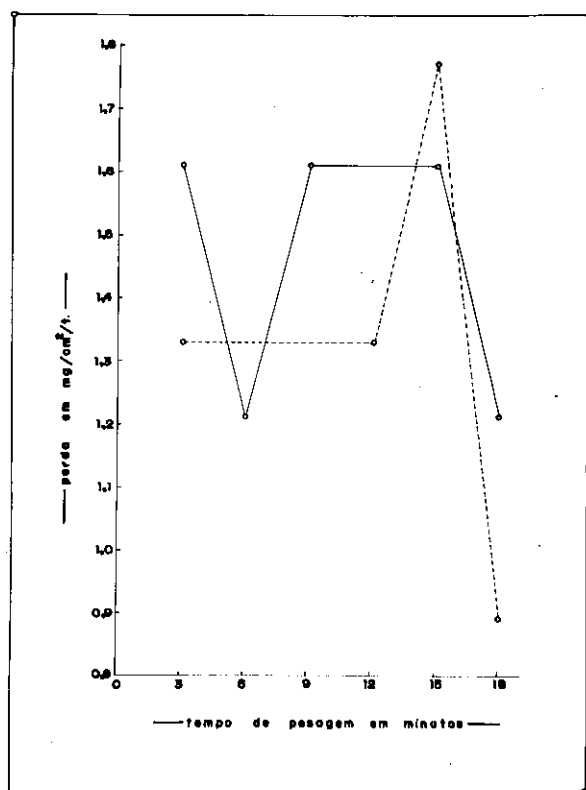


Figura Nº 25. Andamento da transpiração de célula - controle e célula tratada com IAA, durante 7 minutos.

----- Contrôle. UR = 60%.  
 ----- IAA, 10<sup>-3</sup> M, 7 minutos. T = 21 °C.

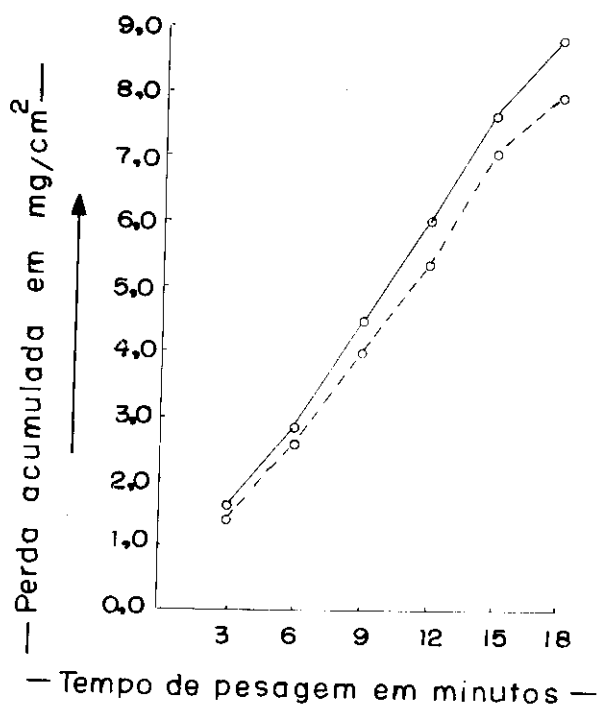


Figura Nº 25a. Curvas de transpiração, de acôrdo com os valores da tabela 16a.

----- Contrôle. ----- IAA.

min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo	
	Contrôle	Tratado
3	1,38	1,56
6	1,38	1,34
9	0,69	0,89
12	1,38	1,34
15	0,92	1,12
18	1,61	1,56

Tabela 17, Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup>M, durante 8 minutos.

UR = 70%.

T = 20,4°C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	1,38	1,56
6	2,76	2,90
9	3,45	3,79
12	4,83	5,13
15	5,75	6,25
18	7,36	7,81

Tabela 17 a. Valores cumulativos de transpiração de células isoladas de Nitella, de acôrdo com a tabela acima.

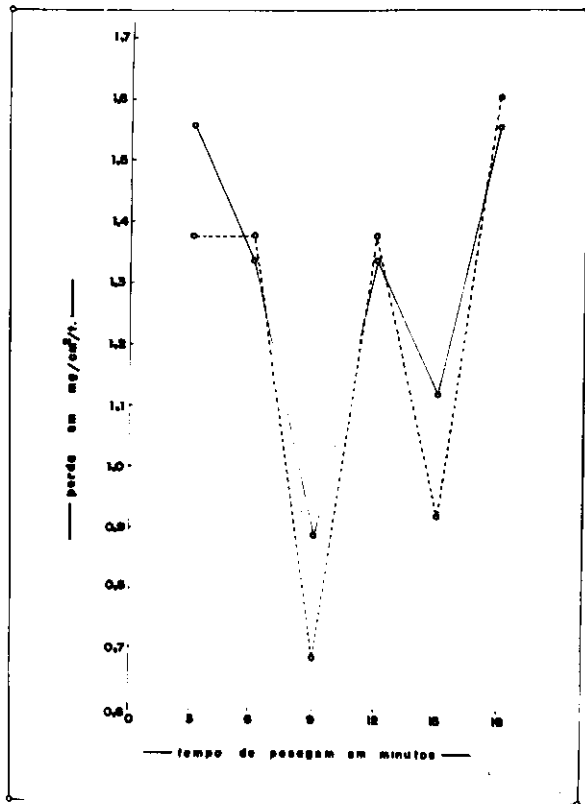


Figura Nº 26, Andamento da transpiração de célula - controle e célula tratada com IAA, durante 8 minutos.

----- Controle, UR = 70%.  
 - - - - - IAA,  $10^{-3}$  M, 8 minutos. T = 20,4 °C.

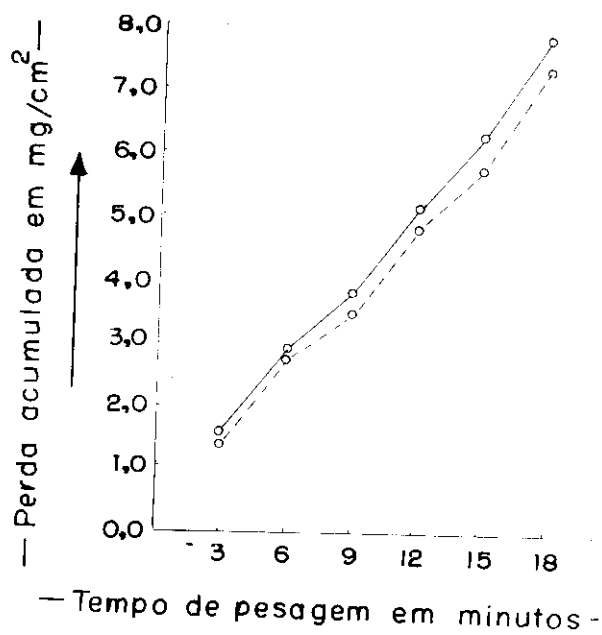


Figura Nº 26a. Curvas de transpiração, de acôrdo - com os valores da tabela 17a.

----- Controle. - - - - - IAA.

Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.		
Min. de pesagem	Contrôle	Tratado
3	1,20	1,40
6	0,90	0,70
9	0,90	1,05
12	0,75	0,70
15	1,05	1,05
18	0,90	1,05

Tabela 18. Valores de transpiração de células isoladas de Nitella. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup>M, durante 10 minutos.

UR = 65%.

T = 21°C.

Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup>		
Min. de pesagem	Contrôle	Tratado
3	1,20	1,40
6	2,10	2,10
9	3,00	2,15
12	3,75	3,85
15	4,80	4,90
18	5,70	5,95

Tabela 18a. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de Nitella, de acordo com a tabela acima.

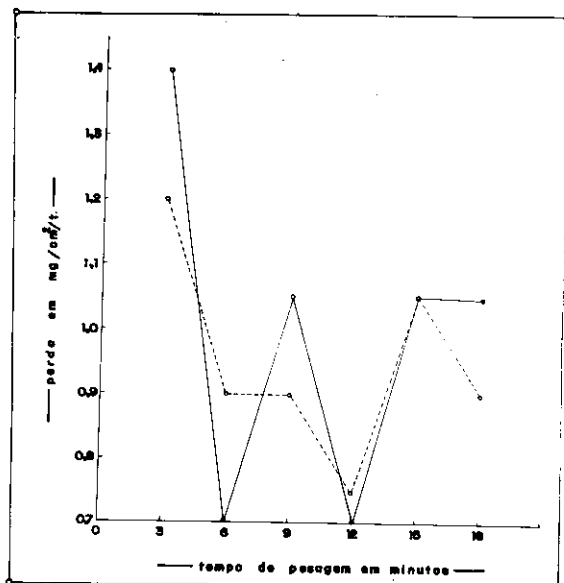


Figura Nº 27. Andamento da transpiração de célula - controle e célula tratada com IAA, durante 10 minutos.

————— Controle, UR = 65%.  
 - - - - - IAA,  $10^{-3}$  M, 10 minutos. T = 21 °C.

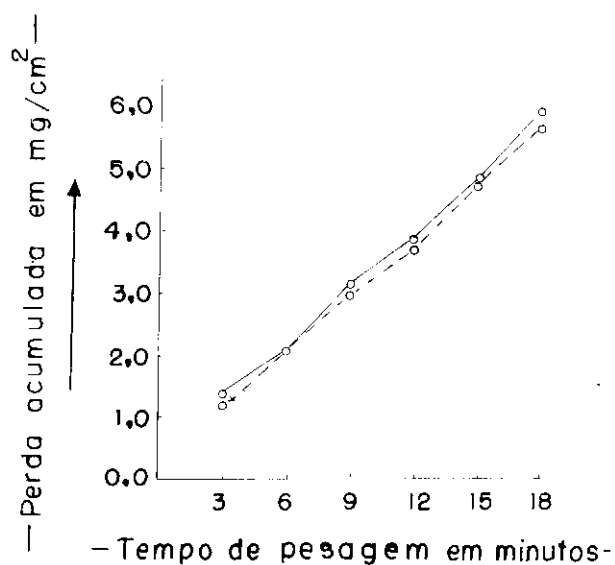


Figura Nº 27ª. Curvas de transpiração, de acordo com os valores da tabela 18ª.

- - - - - Controle.      ————— IAA.

Min. de pesagem	Perda de água em mg/cm <sup>2</sup> /tempo.	
	Contrôle	Tratado
3	1,09	1,14
6	1,09	1,33
9	1,46	1,33
12	0,73	1,14
15	1,09	1,14
18	1,46	1,52

Tabela 19. Valores de transpiração de células isoladas de *Nitella*. Comparação de célula controle com célula tratada com IAA, 10<sup>-3</sup> M, durante 16 minutos.

UR = 68 %.

T = 21,4 °C.

Min. de pesagem	Perda de água acumulada em mg/cm <sup>2</sup> .	
	Contrôle	Tratado
3	1,09	1,14
6	2,18	2,47
9	3,64	3,80
12	4,37	4,94
15	5,46	6,08
18	6,92	7,60

Tabela 19a. Valores cumulativos da transpiração de células isoladas de *Nitella*, de acordo com a tabela acima.

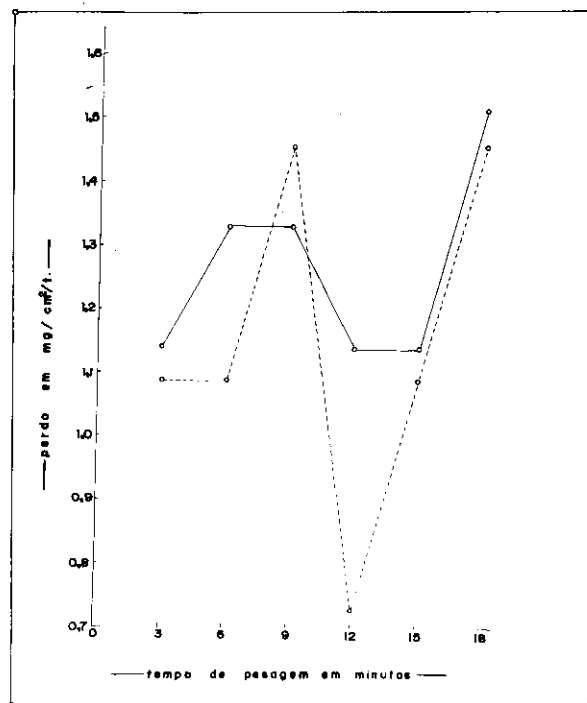


Figura Nº 28. Andamento da transpiração de célula - controle e célula tratada com IAA, durante 16 minutos.

----- Contrôle. UR = 68%.  
 — IAA,  $10^{-3}$  M, 16 minutos. T = 21,4 °C.

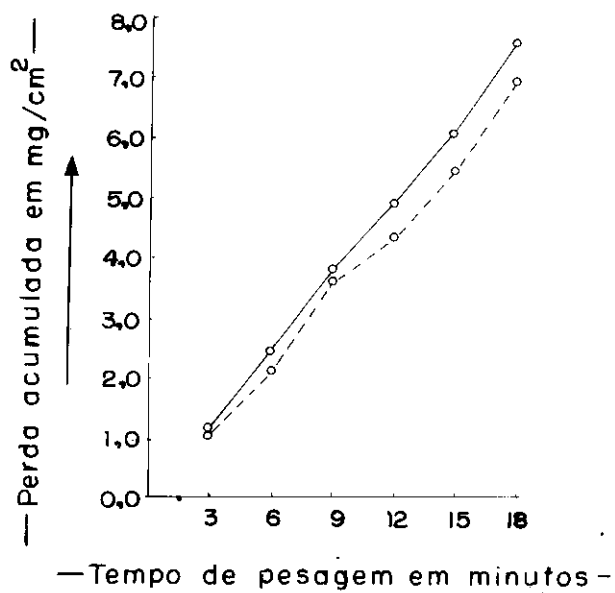
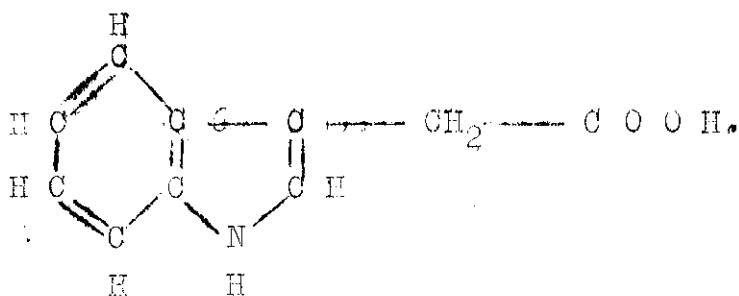


Figura Nº 28a. Curvas de transpiração de acordo com os valores da tabela 19a.

----- -- Contrôle. — IAA.

a- Discussão.

Nos últimos anos surgiram muitos fatos extremamente interessantes sobre o mecanismo de ação das auxinas, mas as diferentes hipóteses sobre a atividade delas, não explicam todos os fatos observados. O ácido β-indol acético é formado de um anel e um grupo carboxil, terminando a cadeia lateral.



Vários pesquisadores observaram que as auxinas provocam um aumento na absorção de água; várias razões foram propostas para explicar esse aumento. Uma delas foi o aumento da permeabilidade das membranas celulares para a água, que foi proposto por Pohl (1948, 1953, 1954), Brauner e Hasman (1949), Guttenberg e Beythien (1951), Meisl e Guttenberg (1952), Buffel (1952), Masuda (1953), Thimann e Samuel (1955), e Müller e Ranshorn (1957). Muitas observações foram feitas sobre o aumento da permeabilidade provocada pelo IAA. Assim, Guttenberg e Kropelin (1947) mediram a deplasmólise média de Rhoeo discolor em IAA e concluíram que a permeabilidade para a água foi aumentada por esta auxina. De acordo com Brauner e Hasman (1949), o aumento da permeabilidade do tecido de batata, induzida por IAA é responsável pelo aumento na absorção de água dentro de 6 horas, e concluíram que o aumento na absorção de água na presença da auxina, foi causado durante as primeiras 24 horas por aumento da permeabilidade, mas após 24 a 48 horas resultou principalmente do aumento da extensibilidade da parede da célula.

O efeito do IAA sobre a permeabilidade é dependente da sua concentração; IAA, em concentração bastante baixa, já produz aumento da permeabilidade. Guttenberg e Beythien (1951) e Meisl e Guttenberg (1952), usando Rhoeo discolor e um modelo de gelatina da membrana celular, observaram que baixas concentrações de IAA (0,1 a 10 ppm) aumentaram a permeabilidade do protoplasma e gelatina, e também o grau de embebição de gelatina na água. Masuda (1953), observou que baixa concentração de IAA aumenta a permeabilidade da membrana para glicerina e uréia, enquanto alta concentração a diminui; disto foi concluído que a auxina afeta as



fases protéicas e lipídicas da membrana. A molécula de IAA, solubilizando parte em lipídeo e parte em água pode ser correlacionada com o efeito de auxina.

Veldstra (1953) observou que o alto grau de solubilidade em lipídeos do anel da molécula de IAA e a solubilidade em água da cadeia lateral, poderia ser correlacionada com a atividade auxínica. A alta atividade superficial liofílica da auxina aponta a membrana protoplasmática como o seu ponto de ação.

Masuda (1955, 1958), afirmou que a auxina aumentou a permeabilidade para a água e não eletrólitos de células da coleoptila de aveia.

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura especializada parecem confirmar a hipótese de que o mecanismo básico de ação da auxina seja sobre as membranas celulares. Assim, Bennet e Clark (1956), Cooil e Bonner (1957) e Tagawa e Bonner (1957) observaram que concentrações relativamente altas de divalentes não-tóxicos, como  $Ca^{++}$ , e trivalentes, inibem fortemente o crescimento de segmentos de coleoptila e esta inibição é revertida por agentes quelantes, como o EDTA, que presumivelmente removem estes íons da parede da célula. (Bennet e Clark (1956). O IAA poderá atuar de modo semelhante ao EDTA, removendo  $Ca^{++}$  dos sais pécticos da membrana e assim eliminando a sua ação cimentante.

Efeitos diretos da auxina na manutenção da permeabilidade diferencial da membrana da célula, foi observado por Sacher (1957) e Sacher e Glasziou (1959); na ausência da auxina, as células perdem a sua permeabilidade diferencial e exudam líquidos em espaços intercelulares, normalmente cheios de ar. Este líquido contém grandes quantidades de sacarose, bem como pectinas, aminoácidos, ácidos orgânicos e algumas enzimas.

O tempo de exposição à solução de IAA, tem um efeito importante na ação dessa auxina. Foi verificado por Abdul-Baki and Rag (1967) que após 45 minutos de exposição à auxina, há o efeito máximo em segmentos do caule de ervilha, onde foram observados os seguintes efeitos:

- 1) 25 - 50% a mais de ATP;
- 2) 100 % a mais de glicose, na forma de celulose, nas membranas;
- 3) grande aumento da respiração.

Provavelmente também o maior efeito sobre a membrana superficial dar-se-á num tempo bem curto. Os resultados obtidos por nós, na transpiração de células de Nitella, indicam um aumento da permeabilidade acima de 5 minutos de exposição ao IAA. As células que

foram assim expostas à solução de IAA, apresentaram, uma perda de água maior do que o controle. Este resultado implica diretamente num aumento da permeabilidade do plasmalema para a água. Esse efeito não foi compensado pelo tratamento posterior com  $Ca^{++}$ , durante um tempo determinado. Isso demonstra que o efeito não pode ser direto, como afirmam os que contestam a hipótese de Bennet-Clark (1956). Pensamos que possa ser atribuído a uma ação indireta sobre o  $Ca^{++}$ , pois as modificações metabólicas produzidas pelo IAA, conduzem à síntese de ácidos nucléicos, de pectinas, etc., que são substâncias altamente fixadoras de íons bivalentes. Assim é também compreensível que o efeito sobre a permeabilidade está em dependência do tempo de exposição ao hormônio, pois as modificações metabólicas introduzidas são, aparentemente, por sua vez, dependentes do fator tempo.

O mecanismo primário de ação da auxina, permanece desconhecido, mas parece claro que a auxina afeta a permeabilidade das membranas celulares.

Resumindo, pode-se concluir que:

- 1) O IAA aumenta a transpiração de células de Nifella, nos 3 primeiros minutos de pesagem, como foi provado pelo teste de t.
- 2) O efeito não é revertido pelo  $Ca^{++}$ , durante um tempo limitado de exposição.
- 3) O tempo de exposição ao IAA tem uma influência e exposição menor do que 5 minutos reduz a transpiração, enquanto tempo mais prolongado, aumenta a transpiração.

## V. A medição direta da saída ou entrada de água.

### 1. Efeito do $\text{Ca}^{++}$ e $\text{K}^+$ e do EDTA sobre o fluxo de água.

A hipótese sobre a qual se apoiou o nosso trabalho - foi a seguinte: a atuação antagônica dos íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  sobre o plasmalema,  $\text{K}^+$  aumentando e  $\text{Ca}^{++}$  reduzindo a passagem de água. Esse efeito foi atribuído a uma alteração das camadas monomoleculares, no sentido de aumentar ou diminuir a permeabilidade para a água.

As experiências sobre a transpiração das células de *Nitella*, demonstram nitidamente que o  $\text{Ca}^{++}$  reduz e o  $\text{K}^+$  aumenta a perda de água das células.

A própria membrana inerte da célula é antagônicamente alterada pelos íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$ . Provanos que a resistência mecânica da membrana celulósica depende da existência do  $\text{Ca}^{++}$ , aparentemente, na forma de pectato de  $\text{Ca}$ .

O EDTA age sobre a membrana celulósica retirando o  $\text{Ca}^{++}$ ; deve agir também sobre a membrana citoplasmática, quelando o  $\text{Ca}^{++}$  e tornando-a mais permeável, como já foi demonstrado nas experiências sobre transpiração.

Também a membrana citoplasmática sofre a ação de íons, que agem sobre a viscosidade, adesividade, etc. do citoplasma. Muitas pesquisas demonstram esse fato. Strugger (1931), estudando o efeito de íons mono e divalentes sobre a plasmólise, observou que íons bivalentes como o  $\text{Ca}^{++}$ , produzem uma plasmólise côncava; o  $\text{Ca}^{++}$  aumenta a viscosidade do citoplasma, que fica ligado à membrana celulósica em alguns pontos, dando essa figura de plasmólise. O contrário aconteceu com íons monovalentes, como o  $\text{K}^+$  que apresentou uma figura convexa, indicando uma diminuição da viscosidade do citoplasma.

Weber (1931, 1934), estudando plasmólise em películas de *Allium cepa*, observou que quando as células foram pré-tratadas com oxalato, que retira o  $\text{Ca}^{++}$ , durante a plasmólise, não formou o plasmalema. Mas quando o  $\text{Ca}^{++}$  foi novamente adicionado, o plasmalema se formou.

Heilbrunn (1956), observou que quando uma célula é rasgada, seu conteúdo, ordinariamente, não dispersa no meio, mas um novo filme ou membrana se forma nos bordos do fluido emergente. A formação deste filme ou membrana foi chamado "surface precipitation reaction". A reação depende da presença de  $\text{Ca}^{++}$ ; se o  $\text{Ca}^{++}$  está presente na solução na qual um ovo de ouriço do mar é quebrado, a reação de precipitação ocorre. Mas se o  $\text{Ca}^{++}$  está -

ausente, então o protoplasma da célula rasgada, dilui-se no meio.

Portanto, íons bivalentes como o  $Ca^{++}$ , influem de modo a aumentar a resistência mecânica da membrana citoplasmática e diminuem a sua permeabilidade.

Assim, admitimos que o tratamento unilateral da célula de Nitella com EDTA pudesse causar na área afetada, a saída de líquido.

O método desenvolvido no presente trabalho, só recentemente têm sido aplicado em estudos de permeabilidade. Sabemos pela literatura que a maioria dos estudos de permeabilidade foram feitos em tecidos, e, nos poucos trabalhos onde células isoladas foram usadas, a célula toda sofreu tratamento. Aqui, foi feito o estudo da permeabilidade em áreas diferentes de uma mesma célula. Pelas técnicas já mencionadas, comparamos um lado da célula tratada de Nitella com um outro não tratado, esperando que porventura houvesse saída ou entrada de água nas duas partes.

Existem poucos estudos desse tipo relativamente à permeabilidade, e sobre a ação específica dos agentes usados não existe nenhum.

Os entre-nós de Nitella, já prontos para a experimentação, eram separados, e a extremidade da célula era tratada com solução 0,0005 N de EDTA, pH 4,5 a 5, durante 5 ou 10 minutos. Já se sabia, pelas experiências pré-liminares, que esse tempo de permanência no EDTA não causa plasmoptise. A célula a ser tratada era colocada verticalmente num tubo de ensaio de 1,1 cm de diâmetro por 18 cm de comprimento, contendo 4 ml de EDTA; os 2 últimos cm celulares ficavam dentro da solução. O resto da célula ficava exposto ao ar saturado de água, pois o conjunto permanecia numa câmara úmida para evitar a perda de água da célula. Para delimitar a porção tratada da não tratada, foi enrolado ao redor da célula um fio passado por lanolina. Este fio separava as duas porções e impedia a subida da solução pela superfície da célula. Passado os minutos de tratamento, a célula era retirada e a porção tratada era enxugada cuidadosamente com papel de filtro.

#### a. Resultados obtidos:

O primeiro cuidado foi verificar o comportamento da célula controle.

Em 4 experiências o resultado obtido foi sempre o mesmo: a célula controle nunca perdia água.

Em seguida, realizaram-se experiências, tratando a extremidade celular com EDTA: 16 experiências com 10 minutos de tratamento e 4 experiências com 5 minutos de tratamento; o resultado obtido foi, invariavelmente, o seguinte: a célula perdia água unilateralmente pela extremidade tratada e o líquido se deslocava no tubo de vidro. Na tabela 20 estão os resultados. Demonstram que a célula não tratada com EDTA, não perde líquido, enquanto que a tratada, sem exceção, o elimina. Nos primeiros experimentos não medimos o volume de líquido excretado pela célula, só o fazendo nos últimos experimentos. Consideramos esses resultados uma prova cabal de nossa hipótese acima formulada.

Admitindo que a saída de líquido era devido a um efeito reversível, podia-se admitir a volta da permeabilidade ao estado normal, pela substituição dos íons de  $\text{Ca}^{++}$ . Para provar a nossa hipótese, as extremidades celulares tratadas com EDTA, sofreram pós-tratamento com soluções de  $\text{CaCl}_2$ . Nessas experiências colocamos a extremidade da célula durante 10 minutos numa solução de EDTA, e em seguida, numa solução de  $\text{CaCl}_2$ , 0,005 M, durante 30 minutos. Com esse tempo de permanência na solução de  $\text{Ca}^{++}$ , ainda saía líquido da célula. Como o tempo de exposição podia ter sido muito curto, aumentamos para 60 minutos o tratamento com  $\text{Ca}^{++}$ ; com esse tempo de tratamento, não notamos eliminação de líquido. Os resultados demonstram que o efeito da quelatação do  $\text{Ca}^{++}$  pelo EDTA é reversível, quando este íon for de novo administrado à célula. A extremidade celular volta à sua permeabilidade normal, quando o tempo de exposição à solução de  $\text{CaCl}_2$ , for prolongado a 50 minutos e mais; em consequência, não perde mais líquido, embora as células continuem túrgidas. (tabela 21).

Procuramos em seguida, verificar qual o tempo mínimo de exposição à solução de EDTA que produz perda de água. Como a célula era tratada durante 10 minutos com EDTA, a perda de líquido já podia existir quando se estava fazendo o tratamento, o qual não era controlado, de modo a se poder medir o líquido que podia estar saindo. Porém, podemos afirmar que se houve saída de líquido, foi em quantidade insignificante, pois em todas as experiências realizadas, a célula quando retirada do frasco de tratamento, sempre estava túrgida.

Para provar nossa hipótese, tomamos uma célula e colocamos mais da metade dela num tubo de ensaio onde havia água e o resto num tubo onde havia 0,2 ml da solução de EDTA. Assim que

Nº da exper.	Minut/ de trat/ com EDTA	Verif/ saída de líquido	Perda em ml
1	0	não	---
2	0	não	---
3	0	não	---
4	0	não	---
5	10	sim	---
6	10	sim	---
7	10	sim	---
8	10	sim	---
9	10	sim	---
10	10	sim	---
11	10	sim	0,150
12	10	sim	0,130
13	10	sim	0,075
14	10	sim	0,135
15	10	sim	0,125
16	10	sim	0,085
17	10	sim	0,095
18	10	sim	0,040
19	5	sim	---
20	5	sim	---
21	5	sim	0,020
22	5	sim	0,018

Tabela 20.

Tratamento da extremidade celular de *Nitella* com EDTA durante tempos diferentes e medida da saída de líquido pela área tratada.

Nº da exper.	Minutos de trat/ com EDTA	Min/ de trat/ post/ com CaCl <sub>2</sub>	Perda de liq. de liq.	Perda em ml
1	10	30	sim	----
2	10	30	sim	----
3	10	30	sim	0,020
4	10	30	sim	0,015
5	10	60	não	----
6	10	60	não	----
7	10	60	não	----
8	10	60	não	----
9	5	50	não	----
10	5	50	não	----
11	5	50	não	----
12	5	50	não	----

Tabela 21.

Células de Nitella tratadas com EDTA e posteriormente com CaCl<sub>2</sub>, mostrando o efeito do Ca<sup>++</sup>. Tratamento da extremidade celular de Nitella com EDTA e tratamento posterior com solução de CaCl<sub>2</sub>, durante tempo variado, e o efeito verificado.

os dois últimos em da extremidade da célula entravam em contacto com a solução, lia-se o menisco sobre papel milimetrado. Verificamos numa série de experiências que o menisco começou a se locomover após 3 minutos. Numa única experiência, observamos a alteração da posição do menisco só após 5 minutos de contacto com a solução de EDTA (tabela 22).

A perda de água não produz perda de turgescência celular, que possa ser notada. Este fato pode ser explicado quando a parte da célula em contacto com a água continua absorvendo, a medida da perda através da extremidade tratada, estabelecendo-se o fluxo unilateral dentro da célula. A célula nº 15 da tabela 20, possuía um volume celular de  $512,2125 \text{ mm}^3$ , o vacúolo corresponde a cerca de 95% do volume total da célula, ou seja  $486,60 \text{ mm}^3$ ; a célula perdeu  $125 \text{ mm}^3$ , que corresponde a 24% do volume da célula. Uma perda de água dessa ordem devia acarretar o colapso celular, devido a pequena distensibilidade da célula de *Nitella cernua* Braun, verificada por Arens (1951) e também por nós. A manutenção do turgor só se explica pela absorção de água através da parte não tratada com EDTA.

Nº da exper.	Tempo em min/ p/ começar a saída	Saída de líquido	quanti/total perdida em ml
1	3	sim	-----
2	3	sim	-----
3	3	sim	0,15
4	3	sim	0,10
5	3	sim	0,20
6	3	sim	0,18
7	3	sim	-----
8	3	sim	-----
9	5	sim	0,10

Tabela 22.

O tempo necessário de contacto com a solução de EDTA até se poder observar o início da saída de líquido, -



e o líquido total excretado durante um tempo variável que durava no mínimo 2 horas.

Para ter uma idéia da eliminação do líquido e a sua parada, fizemos observações, com leituras no intervalo de 5 minutos, desde que a célula entrou em contacto com a solução de EDTA até o menisco ficar estacionário. Os resultados são apresentados na tabela 23. A célula usada possuía 175 mm de comprimento, 0,9 mm de diâmetro e volume igual a  $247,275 \text{ mm}^3$ . Nota-se que a eliminação de líquido estancava no fim de 130 minutos com a eliminação total de  $100 \text{ mm}^3$ . Em quantidade corresponde a 40,4% do volume da célula. O volume eliminado no intervalo de 5 minutos aumentava até atingir o máximo de  $3 \text{ mm}^3$  no fim de 40 minutos, para diminuir mais tarde gradativamente até atingir  $0 \text{ mm}^3$ . Os mesmos dados foram usados para construir um gráfico, representado na figura Nº 29, que ilustra mais claramente os resultados obtidos.

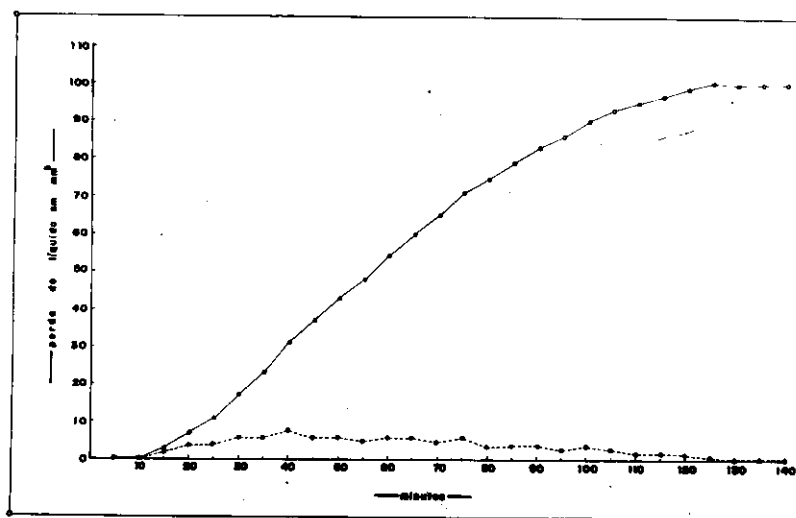


Figura nº 29. A eliminação de líquido em relação ao tempo, com base nos dados da tabela 14.

É possível manter-se uma célula túrgida após 140 minutos, embora perdendo quase 50% do volume, se absorver ao mesmo tempo a água perdida. A experiência prova também que o efeito do EDTA no sentido de aumentar a permeabilidade, desaparece no fim de um determinado tempo, que de acordo com outras experiências realizadas nunca foi inferior a 2 horas, prolongando-se às vezes por muito mais tempo.

A perda de água nos experimentos acima citados, não é possível, admitindo-se um aumento da permeabilidade para a água

Tempo em minutos	Perda de líquido em mm <sup>3</sup> no intervalo de 5 min/	Perda total em mm <sup>3</sup>
0	0	0
5	0	0
10	1	1
15	2	3
20	4	7
25	4	11
30	6	17
35	6	23
40	8	31
45	6	37
50	6	43
55	5	48
60	6	54
65	6	60
70	5	65
75	6	71
80	4	75
85	4	79
90	4	83
95	3	86
100	4	90
105	3	93
110	2	95
115	2	97
120	2	99
125	1	100
130	0	100
135	0	100
140	0	100

Tabela 23. Percurso da eliminação do líquido, observando desde que a célula entrou em contacto com a solução de EDTA, até a parada do menisco.

apenas. O aumento ou diminuição da permeabilidade para a água pode afetar apenas a rapidez da entrada ou saída de água, pois o equilíbrio osmótico da célula se altera só quando, simultaneamente, aumenta a permeabilidade de solutos (Pfeffer, 1877).

Pois Pfeffer, nas suas pesquisas sobre a osmose, estabeleceu três condições em que a célula pode perder líquido numa das suas partes:

1. quando aumenta nessa parte a permeabilidade para solutos do vacúolo.
2. quando nesta parte a concentração de solutos do interior é menor.
3. quando forças osmóticas exteriores retiram água dessa parte.

A solução 0,001 mol de EDTA, representa uma força externa de, mais ou menos, 0,024 at. ou, mais ou menos, 1/250 da força osmótica da própria célula. A solução de EDTA poderá só retirar um volume insignificante de água. Para se obter uma saída de água visível, é necessário empregar soluções com mais de uma atmosfera (Osterhout, 1947; Arens, 1951). A saída de água provocada por uma força osmótica exterior, produz na célula um aumento da concentração no interior que, por vez, deverá provocar uma ligeira absorção de água na parte tratada, que nunca foi observada.

Portanto, pode só sair líquido quando prevalece o caso 1 de Pfeffer. Assim sendo, tentamos verificar a existência de solutos celulares no líquido eliminado. As células de Nitella acumulam concentrações elevadas de  $K^+$  no seu suco vacuolar; por isso, fizemos análise qualitativa da existência do íon  $K^+$ . Recolhemos o líquido perdido por várias células, guardando-o num vidro neutro, rigorosamente limpo, para evitar a contaminação com traços de  $K^+$ . Em seguida, fizemos a reação qualitativa com cobaltinitrito de sódio. Evidenciamos ao microscópio a presença de  $K^+$  devido a formação de um precipitado amarelo de cristais de cobaltinitrito de  $Na^+$  e  $K^+$ . Água destilada guardada no mesmo tipo de vidro não deu esta reação.

A perda de  $K^+$  de uma célula é geralmente acompanhada por uma modificação do potencial de repouso. Tentamos verificar uma alteração do potencial celular após o tratamento com o EDTA. Colocamos a célula em dois compartimentos de uma cuba com água, separando a parte central por meio de vaselina. Os dois compartimentos estavam ligados a um potenciômetro de alta sensibilidade. Nas diversas medições, notamos que, invariavelmente, a porção

tratada com EDTA era negativa em relação a não tratada. Os potenciais elétricos medidos em diversas células oscilavam em média 60 a 70 mv. Isso corresponde a uma depolarização parcial da célula, pois o potencial de repouso da célula de *Nitella* fica ao redor de 100 a 150 mv. A diferença de potencial existente entre as extremidades tratada e não tratada, é variável e a média encontrada foi de 61,5 mv. (tabela 24).

Nº da exp.	Min. de trat. com EDTA	Sinal elétrico da ext. trat. e.n.t.	Difer. de poten. em mv
1	10	negativo posit/	72
2	10	negativo posit/	48
3	10	negativo posit/	19
4	10	negativo posit/	107
5	10	negativo posit/	67
6	10	negativo posit/	59
7	10	negativo posit/	57
8	10	negativo posit/	63

Tabela 24.

Depolarização da célula de *Nitella* produzida pelo tratamento com EDTA.

#### b. Discussão.

Os trabalhos com microscopia eletrônica têm comprovado a teoria de Danielle, que admite que a membrana citoplasmática, ou plasmalema, seja formada de 2 camadas monomoleculares de lipídeos. Os filmes monomoleculares de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa, reduzem a permeabilidade para a água. Por isso, na prática, se emprega álcool cetílico ou hexadecanol em reservatório de água, para reduzir a evaporação. Archer e La Mer (1955), observaram que filmes de ácidos graxos diminuem a permeabilidade para a água; os solventes aromáticos aumentam a permeabilidade dos filmes. Já os filmes protéicos tanto podem reduzir como aumentar a evaporação de água (Janes e Berry, 1963).

Esses filmes de ácidos graxos, quando de carga negativa podem ser alterados antagônicamente por cátions mono e divalentes como o  $Ca^{++}$  e  $K^+$ ; estes cátions podem ligar-se a fos-

folipídeos ou ácidos graxos da membrana, formando sais: os sais de  $K^+$  são solúveis em água, e se encontram dissociados, aumentando a permeabilidade da membrana. Os sais de  $Ca^{++}$  são insolúveis em água e tornam a membrana mais hidrófoba, mecânicamente mais resistente, diminuindo a permeabilidade. Normalmente, as células de Nitella possuem  $Ca^{++}$  na sua membrana, devido ao  $Ca^{++}$  ( $HCO_3$ )<sub>2</sub>, existente na água em que vivem.

Tratando as células com EDTA, retira-se o  $Ca^{++}$  da membrana. Segundo as leis das massas, a retirada do  $Ca^{++}$  da membrana, implica na substituição por outros cationes, existente em maiores concentrações na célula, provavelmente pelo  $K^+$ . Assim, há um aumento da permeabilidade para a água e íons, verificando-se a perda  $K^+$ . Este fato já foi observado por muitos pesquisadores: Yoshida, Kenichi e Fujisawa (1962), trabalhando com cortes a cérebro, notaram a diminuição do conteúdo de  $K^+$  devido ao tratamento com EDTA e o efeito foi revertido por  $Ca^{++}$ . O chamado "Efeito de Vietz" (1944), que consiste na estimulação da absorção do  $K^+$  por células vegetais, baseia-se provavelmente ao mesmo efeito que o  $Ca^{++}$  exerce sobre a estrutura da membrana citoplasmática. Tanada (1955), verificou que a absorção de Rb e P foi aumentada pela presença do  $Ca^{++}$ , sendo o "locus" de ação do  $Ca^{++}$ , sobre a superfície exterior do citoplasma ou próxima a ela. Helder (1958) e Laties (1959) verificaram que o íon  $Ca^{++}$  tem a propriedade de reduzir o efluxo de íons. Epstein (1961) observou que os íons de  $Ca^{++}$  aumentam a integridade do mecanismo acumulador para  $K^+$ , Rb e  $Na^+$ .

Também é conhecido que o afastamento do  $Ca^{++}$  das membranas, inclusive pelo tratamento com oxalatos, citratos, etc., provoca depolarização de células de Nitella (Auger, 1939; Osterhout 1938;). Davson (1951) verificou que nervos colocados em solução fisiológica de Ringer, sem  $Ca^{++}$ , se depolarizam.

Osterhout (1947, 1949), Arens (1951) e outros, provocaram fluxo unilateral através das células de Nitella, pela aplicação de solução hipertônica numa das extremidades celulares. Este fluxo pára no fim de certo tempo, devido ao acúmulo unilateral de solutos na célula, que compensam o efeito da solução exterior. A cessação do fluxo em nossas experiências, pode ser explicado de outra maneira: devido ao fluxo unilateral, o  $Ca^{++}$  que não foi quelado pelo EDTA no interior celular, se desloca, aparentemente, em pequena concentração para o lado desprovido desse elemento. Assim, se restabelece, aparentemente, a permea-

bilidade normal. Provavelmente, haverá uma reabsorção do  $K^+$  eliminado, como acontece em fenômenos regulares de excitação celular.

O EDTA, quando aplicado unilateralmente, numa célula de Nitella, provoca nesta parte:

- 1 - Eliminação de líquido,
- 2 - Tratamento posterior com  $Ca^{++}$ , inibe este efeito.
- 3 - O volume de líquido eliminado pode atingir cerca de 40% do volume total da célula.
- 4 - A célula fica túrgida durante este processo, o que se explica pela absorção de água na parte não tratada, estabelecendo-se um fluxo unilaterial através da célula. A eliminação de água pára no fim de 2 até mais horas, o que se explica pelo restabelecimento da permeabilidade, devido ao transporte de  $Ca^{++}$  dentro da célula.
- 5 - O líquido secretado contém  $K^+$ .
- 6 - Observaram-se diferenças de potencial, em média, entre 60 a 70 mv, ficando a parte tratada negativa. Trata-se aparentemente de um processo regular de excitação.

Estes resultados confirmam os obtidos no tratamento com  $K^+$  e  $Ca^{++}$ , em que se notou, na mesma Nitella, um aumento da evaporação da água, produzido por íon  $K^+$  e uma diminuição pelos íons  $Ca^{++}$ .

## 2. Efeito do IAA sôbre o fluxo de água.

Para fazer a medição direta da permeabilidade para a água foi seguido o método já descrito anteriormente.

Após o tratamento, a célula passava para um conjunto — que é ilustrado na figura 30.

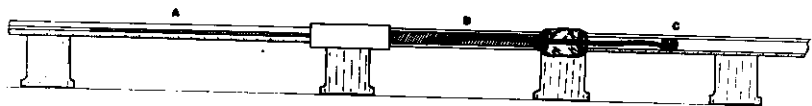


Figura Nº 30. Conjunto para medição do fluxo de líquido (absorção numa extremidade, perda na outra), na célula de Nitella.

O conjunto era formado por três tubos de vidro; A, B e C. O tubo A era capilar e continha água; o tubo B tinha 3 mm de diâmetro e também continha água. O tubo C, tinha 3 mm de diâmetro e ficava vazio. Os tubos A e C eram graduados de modo a permitir fácil leitura. Os 3 tubos foram montados em placa de gesso, num mesmo plano. Após o tratamento, a célula era colocada nesse conjunto, de modo que a porção tratada era enfiada no tubo vazio (C). A porção da célula que ficava entre os tubos B e C, era bem protegida com lanolina. Foram feitas observações da possível absorção de água pela porção não tratada (em A), e da possível perda de água pela porção tratada (em C). As leituras foram feitas em intervalos de 20 minutos, durante uma hora, e depois em intervalos maiores, num total de 20 horas de observação.

O primeiro cuidado foi o de estudar o comportamento da célula contróle, na presença e na ausência da luz, afim de verificar uma influência porventura produzida pela fotossíntese.

Os resultados obtidos estão nas tabelas 25 e 26; com o tempo de observação variando de 18 a 22 horas, verificou-se que as células controle, praticamente, não perdem água, pois o máximo fluxo de líquido foi de  $1 \text{ mm}^3$ , em ambos os casos; na presença da luz, das 5 células observadas, somente 2 perderam  $1 \text{ mm}^3$ ; e das 9 células observadas somente 4 perderam  $1 \text{ mm}^3$  de líquido.

Em seguida, foi feita uma série de experimentos, tratando células de Nitella, unilateralmente, com solução de IAA, 0,005%, durante 10, 30 e 60 minutos. Com 10 minutos de tratamento, não há saída de água da célula. Quando o tratamento é de 30 minutos, saem gotículas de água, mas o fluxo para logo em seguida. Mas no tratamento de 60 minutos, verificamos, invariavelmente, o seguinte resultado: a célula perdia água unilateralmente - pela extremidade tratada, e o líquido se deslocava no tubo de vidro. Esses resultados são apresentados na tabela 27.

A perda de água não produziu perda de turgescência celular. Este fato pode ser explicado: quando a parte da célula - em contacto com a água continua absorvendo, a medida da perda - através da extremidade tratada, estabelece-se um fluxo unilateral dentro da célula. Deste modo a célula continua túrgida (tabela 28).

O exame das tabelas 27 e 28, mostra que várias células tratadas com IAA, absorveram água em quantidade superior a que saiu pela região tratada. A este fato pode-se dar a seguinte explicação: o IAA exerceu um efeito sobre a parede dessas células, aumentando a plasticidade, o que permitiu um certo aumento do volume da célula e, conseqüentemente, maior entrada de água na célula. Por outro lado foi devido ao diâmetro maior do tubo - servindo à medição da saída de líquido ( figura nº 30 ), que - apareceu aparentemente, um erro de leitura. Pois um pequeno volume de água podia ter escapado sem formar um menisco visível. É provável que, na realidade, os volumes absorvidos e eliminados - sejam, praticamente, iguais.

Procurou-se, em seguida, verificar o que acontecia se a célula fosse tratada unilateralmente, com uma solução mais concentrada que a usada anteriormente. Foi feito tratamento unilateral da célula com solução 0,01% de IAA, durante 60 minutos. Verificou-se que quando aumenta a concentração, há um aumento da permeabilidade, e a célula perde mais água em menos tempo (tabela-29).



Exp.	Tempo observ.	Absorção água	saída de líquido
1	22 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
2	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
3	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
4	18 horas	0 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>

Tabela 25.

Observação da absorção de água e saída do líquido de células controle, na presença de luz.

Exp.	Tempo observ.	Absorção água	saída de líquido
1	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
2	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
3	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
4	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
5	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
6	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
7	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
8	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
9	20 horas	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>

Tabela 26.

Observação da absorção de água e saída do líquido de células controle na ausência de luz.

Exp.	Tempo observado	Absorção água	saída de liq.
1	8 horas	-----	20 mm <sup>3</sup>
2	17 horas	-----	50 mm <sup>3</sup>
3	22 horas	6,5 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>
4	22 horas	11,0 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>
5	23 horas	11,0 mm <sup>3</sup>	4 mm <sup>3</sup>
6	22 horas	22,0 mm <sup>3</sup>	4 mm <sup>3</sup>
7	20 horas	14,5 mm <sup>3</sup>	15 mm <sup>3</sup>

Tabela 27.

Verificação da saída de líquido nas extremidades celulares tratadas com IAA, durante 60 minutos.

Tempo	Absorção água	saída de líquido
0 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
20 min.	1,5 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
40 min.	3,5 mm <sup>3</sup>	2 mm <sup>3</sup>
60 min.	6,5 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>
8 horas	24,0 mm <sup>3</sup>	20,0 mm <sup>3</sup>

Tabela 28.

Da absorção de água pela porção contrôle, a saída de líquido pela porção tratada, de célula tratada unilateralmente com IAA.

Admitindo que a saída de líquido era devido a um efeito reversível, podia-se admitir a volta da permeabilidade ao estado normal pela substituição dos íons de  $\text{Ca}^{+}$ . Para provar esta hipótese, células foram tratadas unilateralmente com solução 0,005% de IAA, durante 60 minutos, na presença de luz. Em seguida a este tratamento, a mesma extremidade, sofreu tratamento com  $\text{CaCl}_2$ , 0,001 M durante 60 minutos, também na presença de luz. Após o tratamento, a célula passou para o conjunto de medição. O resultado obtido mostra que o tempo da exposição de 60 minutos na solução de Ca é curto, e reverteu o efeito, só parcialmente, saindo líquido da célula, como se observa na tabela 30: a célula perdeu  $5 \text{ mm}^3$  de líquido em 16 horas.

Aumentou-se o tempo de permanência na solução de  $\text{CaCl}_2$  para 2 horas. Dêste modo, a extremidade da célula sofreu tratamento durante 120 minutos, com solução 0,001 M de  $\text{CaCl}_2$ . O resultado obtido é apresentado na tabela 31: nessa experiência, praticamente não houve eliminação de líquido, pois em 16 horas a célula perdeu só  $0,5 \text{ mm}^3$ ; isto prova que o aumento da permeabilidade provocada pelo IAA é revertido pelo Ca. A célula absorveu  $5 \text{ mm}^3$  de água pela porção não tratada; isso é devido aos possíveis efeitos acima mencionados.

Estudou-se o efeito da luz na ação do IAA (comparar tabelas 25 e 26); sabemos que o IAA acelera a respiração e uma célula no escuro não pode fazer fotossíntese, e portanto, vai ficando com um suprimento de  $\text{O}_2$  cada vez menor; quando o tratamento é bastante longo, como no caso presente, que foi de 60 minutos essa deficiência de  $\text{O}_2$ , poderia acarretar um efeito diferente.

Para verificar a influência da luz, foram montadas experiências em câmara escura; as células eram tratadas unilateralmente com IAA, 0,005%, durante 60 minutos, como foi relatado anteriormente e após passavam para outro conjunto de medição. Os valores obtidos são apresentados na tabela 32; algumas células eliminaram pouco; dêsse resultado e dos apresentados nas tabelas 25 e 26 pode-se concluir que o efeito do IAA sobre a permeabilidade não depende, em escala apreciável da fotossíntese.

### Discussão.

O IAA aumenta a permeabilidade da membrana para a água e íons, provocando a saída de líquido da célula. Na literatura especializada são encontrados trabalhos que se referem a exudação de líquido de células, devido ao ácido indole acético. Assim

Tempo	Absorção água	saída de líquido
0 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
20 min.	0,5 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
40 min.	0,5 mm <sup>3</sup>	0,5 mm <sup>3</sup>
60 min.	3 mm <sup>3</sup>	1,5 mm <sup>3</sup>
2 horas	9 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>
5 horas	45 mm <sup>3</sup>	35 mm <sup>3</sup>
8 horas	48 mm <sup>3</sup>	50 mm <sup>3</sup>

Tabela 29.

A absorção de água pela porção controle e saída de líquido pela porção tratada com IAA, 0,01 %.

Tempo	Absorção água	saída de líquido
0 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
20 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
40 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
60 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
16 horas	12 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>

Tabela 30.

Reversão relativa do efeito produzido pelo IAA, pelo pós-tratamento com Ca 0,001 M.

Tempo	Absorção água	saída de líquido
0 min.	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
20 min.	1 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
40 min.	1 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
60 min.	2 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>
2 horas	3,5 mm <sup>3</sup>	0,5 mm <sup>3</sup>
16 horas	5 mm <sup>3</sup>	0,5 mm <sup>3</sup>

Tabela 31.

O efeito produzido pelo IAA é revertido, quando pós-tratamento com CaCl<sub>2</sub>, é feito durante 2 horas.

Exp.	Tempo observação	Absorção água	saída de líq.
1	22 horas	17 mm <sup>3</sup>	1 mm <sup>3</sup>
2	22 horas	11 mm <sup>3</sup>	5 mm <sup>3</sup>
3	16 horas	7,5 mm <sup>3</sup>	7 mm <sup>3</sup>
4	16 horas	-----	1 mm <sup>3</sup>

Tabela 32.

Influência da luminosidade na absorção de água e saída de líquido em células tratadas unilateralmente com IAA.

Christiansen (1950) observou a exudação de líquidos de seções do talo de ervilha que cresceu na presença de IAA mais iodocetato; o exudado continha frutose, lipídeos, ácido orgânico, asparagina, amino ácidos e fosfato; foi proposto como a causa da exudação o aumento da permeabilidade da membrana da célula.

O aumento da permeabilidade causada pelo IAA está relacionado com o Ca, que pode atuar como um agente quelante. Bennet Clark (1956), Heath e Clark (1956), observaram que um número de agentes quelantes, de constituição química amplamente diferente, estruturalmente não relacionados as auxinas naturais, causam respostas de crescimento iguais às auxinas. Concentrações tão baixas como  $10^{-10}$  M de EDTA deram estimulação mensurável do crescimento da coleoptila de trigo. Isto sugeriu que as auxinas podem ser agentes quelantes e que suas ações fisiológicas podem ser baseadas em tais propriedades. Sabemos que o IAA estimula a síntese de RNA, ácidos pécicos, etc. Estas substâncias são complexadas de Ca; portanto, as auxinas podem retirar o Ca das suas ligações. Foi observado que o tratamento de plantas de Datura stramonium, com 2,4-D, que é uma substância de crescimento, reduziu a quantidade de cristais de oxalato de Ca, normalmente depositado nas células (Wassberg e Goodrich, 1956). Isto sugeriu uma ação sobre o metabolismo do Ca e assim pode explicar a marcada deformação das paredes da célula, do tecido proliferante induzido a formar por 2, 4-D. Uma deformação da parede pode bem ser devido ao desenvolvimento defeituoso da lamela média, resultante da deficiência do Ca. Portanto o aumento da permeabilidade, provocada pelo IAA, pode ser revertido pelo tratamento com Ca, como foi observado nas nossas experiências.

Muitas vezes, a célula absorveu água, numa das extremidades, em quantidade maior do que perdida na outra extremidade. Este fato pode ser explicado através de um efeito do IAA sobre as propriedades da parede da célula. Heyn (1940) observou que aplicações de auxina causam um aumento pronunciado na extensibilidade das paredes da célula; tal aumento permitiria maior absorção de água. Também Tagawa e Bonner (1957) trabalhando com coleoptila de aveia observaram que o efeito da auxina em promover o crescimento, está associado com o aumento na plasticidade e elasticidade das membranas das células.

Portanto, o efeito do IAA sobre permeabilidade é pronunciado, provocando os seguintes efeitos:

- 1) célula tratada unilateralmente com IAA durante 60 minutos, perde líquido pela extremidade tratada.
- 2) o efeito é dependente do tempo de exposição e da concentração do IAA: com aumento do tempo de tratamento e da concentração, há maior aumento da permeabilidade.
- 3) quando ocorre saída de líquido, a célula continua túrgida; a porção não tratada absorve água e mantém a turgescência.
- 4) o efeito é revertido parcialmente ou totalmente por íons de  $\text{Ca}^{++}$ , dependendo do tempo de exposição à solução  $\text{Ca Cl}_2$ .
- 5) o efeito não depende em escala apreciável da fotossíntese.

## VI. RESUMO GERAL.

No presente trabalho estudou-se o efeito dos íons antagônicos  $K^+$  e  $Ca^{++}$ , do quelador EDTA e da auxina IAA, sobre a permeabilidade para a água das membranas citoplasmáticas.

Foi escolhido como material uma espécie de alga da família das Characeas: Nitella cernua Braun. Por possuir células gigantes, a Nitella se torna o objeto para demonstrar com facilidade, o efeito dos íons sobre a permeabilidade do plasmalema.

Estudou-se o efeito dessas substâncias sobre a permeabilidade, através de dois métodos: transpiração de células isoladas e medição direta da saída de líquido de células tratadas.

### A. Efeito sobre a membrana inerte.

1. O efeito do EDTA sobre a resistência mecânica da membrana externa da célula.

Durante os estudos preliminares do efeito do EDTA sobre a permeabilidade do plasmalema, deparou-se com um fenômeno que inutilizou muitas experiências: quando o tempo de tratamento com EDTA é superior a 15 minutos, as células explodem; ocorre plasmoptise. A membrana celulósica arrebenta, rasgando-se em toda a sua circunferência ou se formam furos que não se repara, macroscopicamente. A plasmoptise ocorre devido a transformação do pectato de cálcio insolúvel em sal solúvel, potássico ou sódico do ácido galaçturônico das pectinas, provocado pelo efeito quelador do EDTA.

### B. Efeito sobre as membranas citoplasmáticas.

#### 1. Transpiração de células isoladas.

Na transpiração verificou-se que o  $K^+$  aumenta a perda de água por transpiração das células, enquanto o  $Ca^{++}$  diminui. Esse fato é atribuído a hidratação dos componentes do plasmalema pelo  $K^+$ , aumentando a permeabilidade; e a desidratação pelo  $Ca^{++}$ , pelo efeito de "pinças", diminuindo a permeabilidade.

O EDTA, age também sobre a membrana citoplasmática, quelando o  $Ca^{++}$  tornando-a mais permeável. Nas experiências de transpiração, o resultado obtido foi o seguinte: célula inteira tratada com EDTA, apresentou maior transpiração do que o controle.

Estudou-se o efeito do IAA sobre a transpiração de células isoladas; observou-se um aumento inicial da permeabilidade das células tratadas durante 10 minutos com IAA. O tempo de ex-



-posição têm um certo efeito: exposição menor do que 6 minutos, diminuiu a permeabilidade em relação ao controle; exposição maior do que 6 minutos (até 16 minutos), aumentou a permeabilidade.

## 2. Medição direta da saída ou entrada de água.

Admitiu-se que o tratamento unilateral da célula do Nitella com EDTA podia causar a saída de líquido nessa área. Verificou-se que células tratadas unilateralmente com EDTA, eliminaram líquido pela região tratada: o volume de líquido eliminado pode atingir cerca de 40% do volume total da célula e contém  $K^+$ ; a célula continua túrgida durante este processo, pois a parte não tratada absorve água; trata-se de um processo regular de excitação, ficando a parte tratada, negativa; mediu-se diferenças de potencial entre 60 a 70 mv; o efeito é revertido por  $Ca^{++}$ .

Sabendo pela bibliografia que as auxinas produzem mudanças na absorção de vários materiais pelas células vegetais, estudou-se o efeito do IAA sobre o plasmalema, tratando a célula apenas unilateralmente, com uma solução de IAA. Os resultados obtidos demonstram que a auxina aumenta a permeabilidade da membrana para a água e íons, provocando a saída de água da célula; esse efeito é dependente do tempo e concentração; tratamento posterior com  $Ca^{++}$  reverte o efeito.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- ABDUL - BAKI, A. and RIG, P.M. - Regulation of cell wall synthesis in response to auxin in pea - stems segments. *Plant physiol. Suppl.* - 42:4 (1967).
- AMBROSE, E.J. - Cell movements. *Endeavour*, 24(91): 27 - 32. *Illus.* (1965).
- ARCHER, J.R. and LAMER, V.K. - *J. Phys. Chem.* 59:177 - (1955).
- ARCHER, J. R. and LAMER, V.K. - The rate of evaporation of water through fatty acid monolayers. *J. Phys. Chem.* 59:200 (1955).
- ARENS, K. - Bestimmung des Turgordruckes an einer Einzelzelle mit demm Manometer. *Planta*, 30: - 113-117 (1939).
- ARENS, K. - Contribuição para o conhecimento da absorção e da condução de água nas células de Nitella cernua Braun. Tese, Univ. do Brasil, Rio de Janeiro. (1951).
- AUGER, DANIEL. - L'Activité protoplasmique des cellules végétales - Hermann & Cie, Editteurs. - Paris. (1939).
- BENNET - CLARK, T.A. - A hypothesis on salt accumulation and the mode of action of auxin. In: - *The chemistry and Mode of Action Plant Growth substances*; R.L. Wain and Wightman, eds. Pp. 284-94. *Butterworth Scientific Publications*, London. (1956).
- BIEBL, R. - Der Einfluß der Mineralstoffe auf die Transpiration, In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. IV: 382:422. (1958).
- BRAUNER, L. and HASMAN, M. - Über den Mechanismus der Heteroauxinwirkung auf die Wasseraufnahme von pflanzlichen Speichergewebe. *Bull. Fac. Med. Istanbul*, 12:57-71. (1949).
- BRIAN, R.C. and RIDEAL, E.K. - On the action of plant - growth regulators. *Biochim. et Biophys. Acta* 9:1-18. (1952).
- BRIGGS, W. - A demonstration that the light effect is - due to lateral transport, not destruc - tion. *Science*. 126:210-212. (1957).
- BROOKS, S.C. - The intake of radioactive isotope by li - ving cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 8:171-177. (1940).

- BROOKS, S.C. and BROOKS, M.M. - The permeability of living cells. *Protoplasma Monogr.* 19 - (1941).
- BROOKS, S.C. - Penetration of radioactive isotopes  $p^{32}$ ,  $Na^{24}$  and  $K^{42}$  into *Nitella*. *J. Cellul. & Comp. Physiol.* 38:83-93. (1951).
- BROWN, W.C., SANDINE, W.E. and ELLIKER, P.R. - Lysis of lactic acid bacteria by lysozyme and  $\epsilon$ -thylenediaminetetraacetic acid. *Jour. - Bacteriol.* 83(3):697-698 (1962).
- BUFFEL, K. - New techniques for comparative permeability studies on the oats coleoptile. *Vlaamse Akad. Wetenschap, Belgie*, 14, 7:1-46 - (1952).
- BUNGENBERG DE JONG, H.G. and BONNER, J. - *Protoplasma*, 24:198-218. (1935).
- BUNGENBERG DE JONG, H.G. and SAUBERT, G.G.P. - *Protoplasma*, 28:352-359. (1937).
- BUVAT, R. - *Intern. Rev. Cytol.* 14:41. (1963).
- BUVAT, R. - *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veget.* 11:122 - (1958).
- CHRISTIANSEN, G.S. - The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. V. Nature and significance of the exudate. *Arch. Biochem.* 29:357-368. (1950).
- CLELAND, R. - Effect of auxin upon loss of calcium from cell walls. *Plant Physiology*, 35:581-584. (1960).
- COLLANDER, R. - Der Zellsaft der *Characeen*. *Protoplasma*, 25:201-210. (1936).
- COMMONER, B. and MAZIA, D. - The mechanism of auxin action. *Plant Physiol.* 17:682-685. (1942).
- COOIL, B.J. e BONNER, J. - The nature of growth inhibition by calcium in the *Avena* coleoptile. *Planta* 48:696-723. (1957).
- COUTINHO, L.M. e FERRI, M.G. - Transpiração e comportamento estomático de plantas permanentes do cerrado em campo de Mourão. (Est. do Paraná). *Bol. Fac. Fil. Ci. e Letr. Univ. S. Paulo.* 247; *Botânica*, 17:119-130 - (1960).
- COUTINHO, L.M. - Contribuição ao conhecimento da ecologia da mata pluvial tropical. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. Univ. S. Paulo.* 257; *Botânica*, 18:1-219. (1962).

- DAINTY, J. and HOPE, A.B. - The water permeability of cells of Chara australis. R.Br. Australian J. Biol. Sci. 12:136-45. (1959).
- DAINTY, J. and GINSBURG, B.Z. - J. Theoret. Biol. 5:256. (1963).
- DANIELLI, J.F. and DAVSON, H. - The permeability of natural membranes. 361 pp. The Macmillan Company, New York. (1943).
- DANIELLI, J.F. - Structural factors in cell permeability and Secretion, Symp. Soc. Exp. Biol. No 6, pp. 1-15. (1952).
- DAVSON, H. - A textbook of General Physiology. The Blakiston Co, Philadelphia. (1951).
- EPSTEIN, E. - The essential role of calcium in selective-cation transport by plant cells. Plant - Physiol. 36(4):437-44. (1961).
- FENSOM, D.S. and DAINY, J. - Electro-osmosis in Nitella. Canadian J. of Botany 41:685-691 (1963).
- FERRI, M.G. - Contribution to the knowledge of the ecology of the "Rio Negro Caatinga" (Amazonas) Bull. Res. Council of Israel, 8D (3/4) : 195-208. (1960).
- FISCHER, H. - Ionenwirkungen. Enciclopedia of Plant Physiology, Vol. II: 706-740. (1956).
- GIESE, A.C. - Cell Physiology. W.B. Saunders Company. (1950).
- GREENHAN, C.G. - The relative electrical resistances of the plasmalemma and tonoplast of higher plants. Planta, 69:150-157. (1966).
- GROVES, J. and BULLOCK-WEBSTER, G.R. - British Charophyta. Ray Society. London. Vol I eII. (1917).
- GRUN, P.J. - Ultrastruct. Res., 9:198 (1963).
- GUNAR, I.I., A.M. SINJUKHIN and I.A. OZOLINA. - Rest potential of the cells of Nitella flexilis, filled with artificial salt solutions. - Dokl. Akad. Nauk SSSR. 158 (6): 1430-33, illus. (1964).

- GUTTENBERG, H., and KRÖPPELIN, L. - "Über den Einfluss des Heteroauxins auf das Laminargelenk von Phaseolus. *Planta*, 35:257. (1947).
- GUTTENBERG, H. von and BEYTHIEN, A. - "Über den Einfluss von Wirkstoffen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Planta*, 40:36-69. (1951).
- HANSON, J.E. - Impairment of respiration, ion accumulation and retention in root tissue treated with ribonuclease and ethylenediamine tetraacetic acid. *Plant Physiol.* 35:372-389. (1960).
- HEATH, O.V.S. and CLARK, J.E. - Chelating agents as plant growth substances. A possible clue to the mode of action of auxin. *Nature (London)*, 177:1118-21. (1956).
- EILBRUN, L.V. - An outline of General Physiology. 3rd Edition. Philadelphia. (1956).
- HELDER, R.J. - Studies on the absorption, distribution and release of labelled rubidium ions in young intact barley plants. *Acta. Bot. Neerlandica* 7(62):235-49. (1958).
- HERRMAN, R. - Die Wirkung des Oxalats und der Aethylen-diazirte traessigsäure (A e DTE) auf die Ausbildung des Plasmalemmas bei Zwiebel-epidermiszellen von Allium cepa. *Protoplasma* 58:172-189 (1964).
- HEYN, A.N.J. - The physiology of cell elongation. *Bot. Rev.* 6:515 (1940).
- HOAGLAND, D.R. and A.R. DAVIS - Composition of cell-sap of the plant in relation to absorption of ions. *J. Gen. Physiol.* 5:629-646 (1923)
- HÖBER, R. - Physical chemistry of cells and tissues. Blackiston, Philadelphia. (1945).
- HÖFLER, K. - New facts on water permeability. *Protoplasma* 39:677-683. (1950).
- HOPE, A.B. and WALKER, N.A. - *Australian J. Biol. Sci.* 14:26-44. (1961).
- JAMES, L.R.Jr. and D.J.O. BERRY - Evaporation enhancement by protein films. *Science*, 140:312-14 (1963).
- KERR, T. - The injection of certain salts into the protoplasm and vacuoles of the root hairs of Limnobium spongia. *Protoplasma (Berl)* 18:420-440. (1933).

- LEVITT, J. - The hardiness of plants. New York: Academic Press. (1956).
- LABORIAU, L.G., J.G.B. de OLIVEIRA, G.V. ZAUZA. - Translocação de algumas plantas da caatinga e de climáticas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. II. Comportamento do *Capparis Yeo Mart.* Anais da Academia Brasileira de Ciências. 33(3/4):375-385. (1961).
- LATTES, G. - The development and control of coexisting respiratory systems in slices of dicotyledonous roots. Arch. Bioch. 79:378-391. (1959).
- LEOPOLD, A. CARL - Auxins and plant growth. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles. (1955).
- LUNDEGARDH, H. - Investigations as to the absorption and accumulation of inorganic ions. Annals. Agr. College of Sweden, 8:233. (1940).
- MASUDA, Y. - Über den Einfluss von auxin auf die Stoffpermeabilität des Protoplasmas. Bot. Mag. - Tokyo, 68-180. (1953).
- MASUDA, Y. - Der Einfluß des „Heteroauxins“ auf die Plasma-permeabilität für Harnstoff und Alkylharnstoff. Physiol. Plantarum. 8:527-37. (1955).
- MASUDA, Y. - J. Inst. Polytech., Osaka City Univ., Serv. D, 9:1. (1958).
- MAKIMOV, N.A. e NOZMAEVA, L.V. - Age variations of colloid-chemical properties of protoplasm in vegetable cells. Compt. Rend (Doklady) - Acad. Sci. URSS. 42:277-80. (1944).
- MAGURO, M. - Economia d'água de cana de açúcar. Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. USP., nº 267, Botânica, - 19:5-100. (1963).
- MEINL, G. and von GUTTENBERG, K. - Über den Einfluss von Wirkstoffen auf die Permeabilität des Protoplasmas. III and IV Mitteilung. - Planta, 41:167-89. (1952).
- MÜLLER, E. e RANSHORN, K. - Untersuchungen über die Einwirkung von  $\epsilon$ -indolylsuccinsäure und Nikotin auf Saugkraft und Wasserpermeabilität plasmolyzierter Zellen unter Verwendung einer neuen planimetrischen Methode. de. Flora (Jena). 145:264-312. (1957).
- ODA, KENJI - Polarized and depolarized states of the membrane in *Chara baunii*, with special reference to the transition between the two states. Sci. Repts Tohoku Univ. Serv. IV Biol. 28(1):1-16 illus. (1962).

- OSTERHOUT, W.J.V. - Kolloidzehr, 77:373-382. (1836).
- OSTERHOUT, W.J.V. - Some aspects of selective absorption. J. Gen. Physiol. 5:225-231. (1922).
- OSTERHOUT, W.J.V. - The absorption of electrolyte by large plant cells. Bot. Rev. 13:283-315. (1936).
- OSTERHOUT, W.J.V. and S.E. HILL - Calculations of bioelectric potentials. IV. Some effects of calcium on potentials in Nitella. J. Gen. Phys. 22:139-46. (1938).
- OSTERHOUT, W.J.V. - Some aspects of secretion. I. Secretion of water. J. Gen. Phys. 30:439-447 (1947).
- OSTERHOUT, W.J.V. - Movement of water in cells of Nitella. J. Gen. Phys. 32:553-57. (1949).
- OVERSTREET, R., JACOBSON, L. & HANDLEY, R. - The effect of Calcium on the absorption of potassium by barley roots. Planta Physiol. 27 (3):583. (1952).
- PFEFFER, W. - Osmotische Untersuchungen. Leipzig. (1877).
- POEL, R. - Ein Beitrag zur Analyse der Streckungswachstums der Pflanzen. Planta, 36:230-61. (1948).
- POEL, R. - Zur Reaktionsweise des Wachstoffs bei der Zellstreckung. Z. Bot. 41:343. (1953).
- POEL, R. - Zur Frage einer Wachstoffsinduzierten nicht osmotischen Wasseraufnahme bei der Zellstreckung. Planta, 44:136. (1954).
- PRESTON, R.D. - Mechanical properties of the cell wall - In: Encyclopedia of plant Physiology. (1955).
- PROBINE, M.C. and R.D. PRESTON - Cell growth and the structure and mechanical properties of the wall in internodal cells of Nitella opaca. I. Wall structure and growth. J. Exper. Bot. 12:261. (1961).
- RAVITSCHER, F.K. - Observações sobre a transpiração de plantas brasileiras. Ceres. 5(25):1-16. (1943).
- REINDERS, D.E. - The process of water-intake by discs of potato tuber tissue. Proc. Roy. Acad. Sci. Amsterdam. 41:820-831. (1938).
- REINDERS, D.E. - Intake of water by parenchymatic tissue. Rec. Trav. Bot. Néerl. 39:1-140. (1942).
- ROBERTSON, J.D. - The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Biochem. Soc. -

- Symp. (Cambridge), Engl. 16:3-43. -  
(1959).
- ROBERTSON, J.D. - Membrane Structure and Function. Science. 158 (1937):146-161. (1967).
- SACHER, J.A. - Relationship between auxin and membrane-integrity in tissue senescence and abscission. Science, 125:1199-2000 (1957).
- SACHER, J.A. and GLASZIOU, K.T. - Nature, 183:757-8 -  
(1959).
- SALTON, M.R.J. - Bacterial membranes In: The specificity of cell surfaces. DAVIS, B.D. and L.W. -  
WARREN, London. (1965).
- SEEMANN, F. - Der Einfluß von Neutralsalzen und Nichtleitern auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Protoplasma (Wien) 42(3): -  
109-132 (1953).
- STRUGGER, S. - Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionen auf das Protoplasma der Wurzelhaare von Hordeum vulgare. L. I. Sitzber d. Akad. d. Wiss. Wien., Matem. Naturw. Kl. I. 135-543. (1926).
- STRUGGER, S. - Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. Ber. D. Deutsch.-  
Bot. Ges. 49-453. (1931).
- TAGAWA, T. and BONNER, J. - Mechanical properties of the Avena coleoptila as related to auxin and to ionic interactions. Plant. Physiol. -  
32:207-15. (1957).
- TAMURA, T. - Effects of ultraviolet radiation and calcium and their interaction on salt absorption by excised mung bean roots. Plant Physiol. 30(3):221. (1955).
- TRIMANN, K.V. and SAMUEL, E.W. - The permeability of potato tissue to water. Proc. Nat. Academ. -  
Sci., U.S. 41:1029-33. (1955).
- TRIMANN, K.V. and TAKAHASHI, N. - Plant Growth Regulation, Intern. Conf. 4th. Yonkers, N.Y., 1959 :  
36-80 (Iowa State Univ. Press, Ames, Ia.)  
(1961).
- THOMSON, W.W. - Observation on the ultrastructure of the Plasmalemma in Oranges. J. Ultrastructure. Res., 16:640. (1966).
- TORIBARA, T. and KOVIL, L. - Determination of calcium in solutions containing ethylenediaminetetraacetic acid. Jour. Lab. and Clin. Med. -  
57(4):630-634. (1961).



- TRUE, R.H. - Amer. Jour. Bot. 1:255. (1914).
- TRUE, R.H. and BARTLETT, H.H. - The exchange of ions between the roots of Lupinus albus and culture solutions containing two nutrient salts. Amer. Jour. Bot. 2:255-311 (1915).
- TRUE, R.H. and BARTLETT, H.H. - The exchange of ions between the roots of Lupinus albus and culture solutions containing three nutrient salts. Amer. Jour. Bot. 3:47. (1916).
- VELDSTRA, H. - Considerations on the interactions of ergons and their substrates. Biochim. Biophys. Acta 1:364-78. (1947).
- VELDSTRA, H. On the relation structure activity with plant growth regulators. Proc. 2nd Int. Congr. Pl. Proto. (1949):
- VELDSTRA, H. - The relation of chemical structure to biological activity in growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol. 4:151-98. (1953).
- VIETS, F.G. - Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulations by excised barley roots. Plant Physiol. 19(3): 466-80. (1944).
- YOSHIDA, HIROSHI, KENICHI and HISAO FUJISAWA - Studies on the change in ionic permeability of brain slices. Japanese Journ. Pharmacol. 12(2):146-55 (illus.). (1962).
- WASEL, J. - The effect of Ca on the uptake of monovalent ions by excised barley roots. Physiol. - Plantarum. 15(4):709-724. (1962).
- WASSBERG, C. and GOODRICH, F.J. - A study of the anatomical effects produced in the leaves of Datura stramonium L. by the action of 2,4 dichlorophenoxyacetic. J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Edit. 45:495-7. (1956).
- WEBER, F.R. - Plasmolyse und "Surface precipitation reaction", Protoplasma. 15:522. (1931).
- WEBER, F.R. - Plasmalemma Zerstörung und Tonoplastenbildung. Protoplasma. 21:424. (1934).

### VIII. Agradecimentos.

Nossos sinceros agradecimentos, às pessoas que nos possibilitaram a elaboração da presente tese; em particular ao Prof. Dr. Karl Arens, Regente da Cadeira de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, pela valiosa orientação no estudo da permeabilidade; à Profa. Dra. Thusnelda Arens, que sempre nos incentivou neste trabalho; ao Prof. Oswaldo Cesar, pela ajuda na revisão de alguns manuscritos; aos Srs. Homero do Amaral, Evaldo W. Ragonha, José Inácio Bertanha, José Cecilio Toledo, pela útil colaboração nos serviços Técnicos.

Às pessoas que nos prestaram auxílio e cujos nomes foram, involuntariamente, esquecidos, as nossas excusas e nossa gratidão.