

ALGUMAS INFORMAÇÕES SÔBRE A CAPACIDADE
RÍTMICA DIÁRIA DA FIXAÇÃO E ACUMULAÇÃO
DE CO₂ NO ESCURO EM EPÍFITAS E ERBÁCEAS
TERRESTRE DA MATA PLUVIAL

LEOPOLDO MAGNO COUTINHO

*ALGUMAS INFORMAÇÕES SÔBRE A CAPACIDADE RÍTMICA
DIÁRIA DA FIXAÇÃO E ACUMULAÇÃO DE CO₂ NO ESCURO
EM EPÍFITAS E ERBÁCEAS TERRESTRES DA MATA
PLUVIAL*

LEOPOLDO MAGNO COUTINHO

Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

A suculência foliar é um caráter que aparece com relativa frequência entre espécies epífitas e erbáceas terrestres da mata pluvial, variando sua intensidade de espécie para espécie. Particularmente entre as Orchidaceae e Gesneraceae da mata este caráter se manifesta de maneira mais notória, enquanto que em certas Bromeliaceae é, em geral, inconspícuo. Em alguns casos esta suculência é determinada pelo desenvolvimento pronunciado de um tecido aquífero incolor, independente portanto dos tecidos clorofilianos. Em outros, os próprios tecidos fotossintetizantes é que conferem aquêlê caráter ao limbo foliar, em consequência do grande tamanho de suas células ou do grande número de camadas celulares, ou ainda de ambos (2), (3). Nas Cactaceae são os caules que desenvolvem tal caráter.

Muitas epífitas e erbáceas terrestres vivem em condições edáficas e microclimáticas que, com relativa facilidade, podem se tornar áridas. Por isso compreende-se que muitas destas plantas comportem-se como espécies altamente homeohídricas, apresentando grande capacidade de restrição de seu consumo hídrico, chegando mesmo a manter seus estômatos fechados durante grande parte do dia (2). Todavia, esta adaptação com respeito ao balanço hídrico do indivíduo seria, por outro lado, desfavorável, uma vez que impediria a assimilação normal de CO₂ pela planta.

Os fatos acima expostos levaram-nos a pensar na possibilidade de tais plantas apresentarem um tipo de metabolismo semelhante àquele de certas Crassulaceae, onde a assimilação do gás carbônico é feita no escuro, à noite, fenômeno este conhecido na literatura como "efeito de De Saussure".

Em inúmeros testes que realizamos com algumas epífitas e erbáceas terrestres da mata pluvial, de fato verificamos que algumas das espécies investigadas apresentavam tal capacidade (3). Salientamos, então, as vantagens da combinação das duas adaptações para o balanço hídrico das plantas.

No presente trabalho procuramos investigar se esta capacidade de fixação e acumulação de CO₂ no escuro é periódica ou se tais plantas dispõem dela durante as vinte e quatro horas do dia. Além disto procuramos verificar se a acumulação de CO₂ se faz de maneira semelhante à das Crassulaceae, pelo acúmulo de ácidos orgânicos durante a noite e consumo durante o dia.

MATERIAL E MÉTODOS

As determinações da periodicidade diária da fixação de CO₂ no escuro foram realizadas em seis espécies: *Epidendrum ellipticum* Grah. (Orchidaceae), *Billbergia amoena* (Lodd.) Ldl. (Bromeliaceae), *Quesnelia testudo* Lindm. (Bromeliaceae), *Aechmea pectinata* Bak. (Bromeliaceae), *Vriesia inflata* (Wawra) Wawra (Bromeliaceae) e *Hypocyrtia radicans* Kl. et Hnst. (Gesneraceae). Com exceção da primeira, que formava densa touceira no chão em nossos jardins, todas as demais espécies foram cultivadas em vasos, no interior de um ripado.

A forma de acumulação do CO₂ no escuro foi investigada em *Epidendrum ellipticum* e *Hypocyrtia radicans*, a primeira com "efeito de De Saussure" e a segunda sem tal efeito (3), para fins de comparação.

A capacidade de fixação de CO₂ no escuro foi determinada por nós pelo método colorimétrico de análise do CO₂, elaborado por Kauko (6) e posteriormente utilizado em fisiologia por diversos pesquisadores (1, 8, 12, 11, 3, 4). Uma análise dos limites e possibilidades do emprego de tal método pode ser encontrado no trabalho

de Lieth (7). As fôlhas ou segmentos do limbo eram colhidos, colocados em uma câmara úmida e trazidos para o laboratório. Uma vez constatada a ausência de epífitas eram imediatamente colocados nos tubos de ensaio, apoiados sôbre uma pequena tela de nylon. Cada tubo utilizado continha 4 ml de solução reagente (84 mg/1 de NaHCO₃, 7,46 g/1 de KCl e 10 mg/1 de vermelho de cresol), já em equilíbrio com o teor de CO₂ do ar. Os tubos eram, então, fechados e levados para uma câmara escura de temperatura constante (20°C, ± 1°C). A duração de cada experimento foi de uma e meia a duas horas aproximadamente, após o que já se podiam observar os resultados pela mudança de coloração da solução dos tubos, em comparação à do tubo de contrôle. As determinações de capacidade de fixação de CO₂ no escuro foram feitas em intervalos de aproximadamente três horas, usando-se para cada determinação dez provas paralelas.

Em *Epidendrum ellipticum* e *Hypocyrtia radicans* foram feitas ainda determinações da variação do pH e do teor de ácidos orgânicos no suco foliar, em intervalos de cêrca de três horas. A extração do suco foi feita triturando-se parcialmente uma certa quantidade de fôlhas no liquidificador, até se obterem fragmentos relativamente pequenos e depois prensando o material entre discos de papel de filtro num espremedor de alho. Cêrca de 20 ml do suco eram, então, centrifugados durante 15 minutos a 2.400 r.p.m., obtendo-se ao fim dêste prazo uma solução sobrenadante hialina. Esta solução era, então, usada no potenciômetro. Em seguida à determinação do pH, tomavam-se 10 ml da solução para a determinação do teor de ácidos orgânicos. Colocados num tubo de ensaio, era juntado igual volume de uma solução saturada de acetato de chumbo, formando-se imediatamente um precipitado branco de sais orgânicos de chumbo (método de Hartmann e Hillig (5) para separação dos ácidos orgânicos*). Uma vez filtrado em papel de filtro duplo e lavado várias vêzes com água destilada, o precipitado era colocado em estufa a 70°C até obtenção de pêso sêco constante, determinado numa balança analítica Becker. Embora êste método gravimétrico

* Êste método tem sido usado por outros autores na determinação quantitativa de ácidos orgânicos (10).

não seja de grande sensibilidade, êle nos foi útil, em vista da grande quantidade de suco utilizada em cada determinação.

A marcha diária da temperatura e da intensidade luminosa foi também traçada para os dias em que realizamos as determinações, usando-se para tanto um termógrafo e um fotômetro. Os dados de temperatura foram obtidos à sombra, no interior do ripado, enquanto que aquêles de intensidade luminosa foram medidos fora, a plena exposição. Dentro do ripado as intensidades luminosas variaram entre 20 e 30% da intensidade exterior.

RESULTADOS

a — *Testes colorimétricos*

Os resultados dos testes colorimétricos de fixação de CO₂ no escuro, efetuados nas várias horas do dia para as seis espécies investigadas, acham-se expressos na Tabela.

Podemos verificar inicialmente que *Hypocyrtia radicans* e *Vriessia inflata*, duas epífitas da mata pluvial, a primeira com forte succulência foliar e a segunda com fôlhas normais, não apresentaram qualquer indício de fixação de CO₂ no escuro, repetindo, assim, em época diversa, os resultados obtidos por nós em trabalho anterior (3). As demais espécies: *Epidendrum ellipticum*, *Billbergia amoena*, *Quesnelia testudo*, *Aechmea pectinata*, tôdas apresentaram capacidade de fixar CO₂ no escuro. Todavia, esta capacidade não se manifestou de maneira continuada, permanente, mas obedecendo, como se depreende dos dados da tabela, a uma periodicidade diária. Só nos períodos compreendidos entre 16 e 7 horas é que tal capacidade se manifestou, superpondo-se, assim, ao período noturno. A partir de 7 horas tôdas estas espécies perderam aquela capacidade, passando, então, a eliminar CO₂ pelas fôlhas ao invés de absorvê-lo. Deve-se notar ainda que o início e o fim dos períodos de fixação ocorrem ao mesmo tempo para as diversas espécies e para os diversos dias. Os períodos de fixação, embora se sobreponham ao período noturno, são, todavia, um pouco mais longos. Assim é que, as plantas já desenvolvem sua capacidade de fixação de CO₂ no escuro antes mesmo de anoitecer, isto é, entre 16 e 19 horas, quan-

TABELA
 PERIODICIDADE DA CAPACIDADE DE FIXAÇÃO DE CO₂ NO ESCURO.

Espécies	HORAS													
	7	19	7	19	7	19								
<i>Epidendrum ellipticum</i>	—	—	+	+	—	±	+	—	—	±	+	+		
<i>Billbergia amoena</i>	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+	
<i>Quesnelia testudo</i>	—	—	±	+	+	±	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>Aechmea pectinata</i>	—	—	±	+	+	±	—	—	—	—	±	+	+	+
<i>Vriesea inflata</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hypocyrtia radicans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ : testes 100% positivos.

— : testes 100% negativos.

± : testes em parte positivos, em parte negativos.

do ainda é dia. Desta forma, os períodos em que tal capacidade se manifesta são de aproximadamente 15 horas, enquanto que nas 9 horas restantes essa capacidade é perdida. Com efeito, experiências efetuadas com *Billbergia amoena* e *Epidendrum ellipticum* e publicadas em um trabalho anterior (4), mostram que entre 10,30 e 11,30 horas os seus pontos de compensação são extremamente altos, não nos sendo possível determiná-los; entre 16,30 e 17,30 eles já se encontravam ao redor de 2.000 Lux. A partir de então não havia mais necessidade de luz para a fixação de CO₂. *

b — *Comportamento de Epidendrum ellipticum.*

Conforme já salientamos na metodologia, investigamos em *Epidendrum ellipticum* não só a sua capacidade de fixação de CO₂ no escuro durante as várias horas do dia, como também procuramos determinar qual a forma em que este CO₂ absorvido é acumulado.

No gráfico 1 acham-se expressos os diversos dados obtidos para esta espécie, com respeito à fixação de CO₂ no escuro, pH do suco celular e teor em ácidos orgânicos, avaliados na forma de sais de chumbo. Podemos aí observar a variação das condições de luminosidade e temperatura dos vários dias. Podemos ainda notar que os valores de pH do suco e de conteúdo em ácidos orgânicos seguem uma curva perfeitamente periódica, concordando entre si e com os dados de fixação de CO₂. Pode-se verificar que a partir de 7 horas, quando a planta não é mais capaz de fixar CO₂ no escuro, o pH do seu suco celular começa a se elevar, atingindo um valor máximo às 16 horas. A partir de então decresce novamente, coincidindo este decréscimo com o período de fixação. Os dados de teor em ácidos orgânicos do suco celular concordam perfeitamente com as variações do pH observado.

Alguns testes de fixação de CO₂ foram realizados durante o dia expondo as folhas à luminosidade natural. Até mesmo neste caso não houve fixação daquele gás.

* Neste trabalho tomamos como ponto de compensação aquela intensidade luminosa em que não havia trocas aparentes de CO₂ entre a folha e o meio.

Estes dados todos parecem indicar que o tipo de metabolismo de CO₂ de *Epidendrum ellipticum* é semelhante àquele observado em Crassulaceae, nas quais o CO₂ assimilado é acumulado na forma de ácidos orgânicos, que, no período de luz, são decarboxilados e utilizados na fotossíntese. Não podemos todavia afirmar qual o ácido aqui especificamente acumulado.

Podemos ainda inferir que esta periodicidade seja de natureza endógena, uma vez que no período do dia, em presença ou ausência de luz, as folhas não fixam CO₂ do ar.

c — *Comportamento de Hypocyrtia radicans.*

Para fins de comparação, apresentamos no gráfico 2 os dados obtidos em *Hypocyrtia radicans*, espécie sem “efeito de De Saussure”, com relação às variações de luminosidade e temperatura dos dias de trabalho, bem como das variações de pH e conteúdo em ácidos orgânicos do suco foliar.

Pode-se observar que uma certa periodicidade existe quanto ao pH do suco celular, apresentando um ligeiro decréscimo à noite e acréscimo nas primeiras horas do dia. Todavia os valores oscilam muito pouco, mantendo-se sempre num nível relativamente alto, quando os comparamos com aqueles obtidos em *Epidendrum ellipticum*. O pequeno decréscimo observado à noite poderia ser interpretado como sendo conseqüente apenas do acúmulo de CO₂ proveniente da própria respiração das células das folhas. Pela manhã, a pequena ascensão observada seria devida à utilização deste CO₂ pela fotossíntese. Quanto à concentração de ácidos orgânicos, podemos verificar que ela é bastante baixa, sendo que qualquer possível oscilação dos valores escapa à sensibilidade do método empregado.

Com estes dados podemos comparar o comportamento de duas espécies de folhas suculentas, uma com “efeito de De Saussure” e outra sem.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos e aqui apresentados podemos inferir que a capacidade de fixação de CO₂ no escuro das espécies investigadas

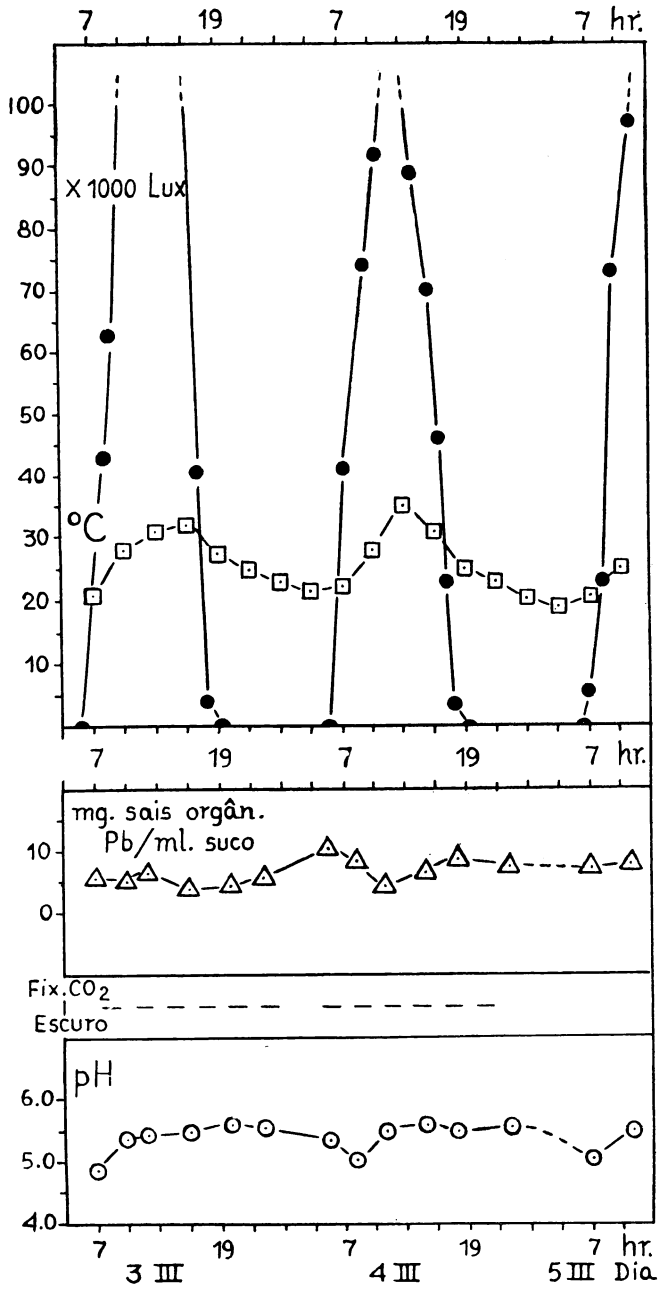


Gráfico 2 — *Hypocyrtia radicans*: andamento diário das condições de temperatura e luminosidade ambientes, teor de ácidos orgânicos e pH do suco celular e da capacidade de fixação de CO₂ no escuro.

é periódica, obedecendo a um ciclo de 24 horas e coincidindo o período de fixação com o período noturno.

Quanto ao metabolismo de CO₂ de *Epidendrum ellipticum*, nossas observações parecem indicar estar êle ligado ao dos ácidos orgânicos, devendo o CO₂ absorvido durante o período de fixação ser utilizado na formação dos mesmos. Durante o dia êstes ácidos seriam decarboxilados, sendo o CO₂ libertado empregado na fotosíntese.

A incapacidade de absorção de CO₂ no escuro durante o período diurno, apresentado pelas espécies com "efeito de De Saussure", indica-nos tratar-se aqui de uma periodicidade de natureza endógena, semelhante àquela descrita em certas Crassulaceae. Êstes fenômenos periódicos cujo contrôle parece ser devido a fatores internos das plantas, nem sempre são facilmente aceitos por todos. A inexistência de dados e observações que permitam explicar êste ritmo endógeno de certos fenômenos é o principal argumento daqueles que não crêem em tal natureza rítmica. Todavia, não vemos razão para negar a possibilidade de sua existência, uma vez que na fisiologia animal são numerosos os exemplos de tais fenômenos cíclicos, cuja periodicidade é controlada endôgenamente. Nada impede, pois, que fenômenos semelhantes possam ocorrer entre os vegetais. Essa idéia é, aliás, defendida por numerosos fisiologistas que têm se dedicado ao estudo de tais fenômenos no reino vegetal (veja-se por exemplo Nuernbergk 9).

SUMMARY

In a previous paper we have shown that some epiphytes and ground herbs of the rain forest may present the "De Saussure effect", i. é, dark fixation of CO₂.

The problem of periodicity of such capacity was investigated in this paper. As we can see from the data presented here, the epiphytes and ground herbs with that effect show a typical daily periodicity of dark fixation of CO₂. The period when these species present such capacity goes from 4 p.m. to 7 a.m.

Determinations of pH and amount of organic acids in the leaf juices of *Epidendrum ellipticum* show a perfect correlation with the

Ja

periods of fixation, resembling the kind of acid metabolism of some Crassulacean plants.

The author assumes that an endogenous rhythm may be controlling this daily periodicity of dark fixation of CO₂.

AGRADECIMENTOS

Desejamos consignar aqui nossa profunda gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Rockefeller Foundation, as quais proporcionaram fundos para a realização do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ALVIK, G., 1939 — Über Assimilation und Atmung einiger Holzgewächse im west-norwegischen Winter. Meddel Nr. 22 fra Vestl. Forstl. Forsoket 6-4 (cit. por 7).
- 2 — COUTINHO, L. M., 1962 — Contribuição ao conhecimento da ecologia da mata pluvial tropical. Bol. Fac. Fil. Ciên. Letr., U.S.P., N.º 257, Botânica 18, 1-219.
- 3 — COUTINHO, L. M., 1963 — Algumas informações sobre a ocorrência do "efeito de De Saussure" em epífitas e erbáceas terrestres da mata pluvial. Bol. Fac. Fil. Ciên. Letr., U.S.P., N.º 288, Botânica 20, 83-98.
- 4 — COUTINHO, L. M., — No prelo — Untersuchungen über die Lage des Lichtkompensationspunktes einiger Pflanzen zu verschiedenen Tageszeiten mit besonderer Berücksichtigung des "de Saussure-Effektes" bei Sukkulenten. Deutsche Fassung von H. Lieth.
- 5 — HARTMANN, B. G. and F. HILLIG, 1934 — Acid constituents of food products: Special reference to citric, malic and tartaric acids. Assoc. Off. Agr. Chem Journ., 17: 522-531.
- 6 — KAUKO, Y., 1934 — Mathematische und graphische Behandlung des Gleichgewichtes Base-Kohlensäure-Wasser bei den verdünnten Lösungen. Ann. Acad. Sci. Fenn. A 39: 1-83.
- 7 — LIETH, H., 1958 — Grenzen und Anwendungsmöglichkeiten der colorimetrischen CO₂-Bestimmung. Planta, 51: 705-721.
- 8 — LIETH, H., 1960 — Über den Lichtkompensationspunkt der Landpflanzen. Planta, 54: 530-576.
- 9 — NUERNBERGK, E. L., 1961 — Endogener Rhythmus und CO₂ — Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalen Säurerythmus. Planta, 56: 28-70.

- 10 — SINCLAIR, W. B. and R. C. RAMSEY, 1944 — Changes in the organic-acid content of Valencia oranges during development. *Bot. Gaz.* **106**: 140-148.
- 11 — WALTER, H., 1949 — Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. *Ber., dtsh. Bot. Ges.* **62**: 47-50.
- 12 — ZELLER, O., 1951 — Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. *Planta*, **39**: 500-526.