

ALGUMAS INFORMAÇÕES SÔBRE A OCORRÊNCIA DO  
"EFEITO DE SAUSSURE" EM EPÍFITAS E ERBÁCEAS  
TERRESTRES DA MATA PLUVIAL

LEOPOLDO MAGNO COUTINHO



*ALGUMAS INFORMAÇÕES SÔBRE A OCORRÊNCIA DO  
"EFEITO DE DE SAUSSURE" 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

O metabolismo do gás carbônico da grande maioria das plantas verdes, fotossintetizantes, caracteriza-se por uma periódica modificação nas trocas daquele gás entre planta e atmosfera circundante, dependendo da presença ou ausência de luz.

Em intensidades luminosas superiores ao seu ponto de compensação de luz, os órgãos assimiladores absorvem  $\text{CO}_2$  do ar, fixando-o predominantemente na forma de carboidratos, por atividade fotossintética. A razão desta absorção é função, dentro de certos limites, da intensidade luminosa.

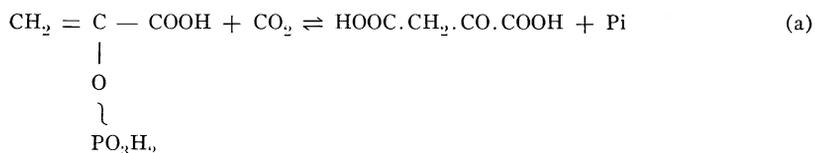
Abaixo do ponto de compensação de luz, observa-se um fenômeno inverso, isto é, os órgãos assimiladores eliminam  $\text{CO}_2$ , o qual provém da respiração.

Certas plantas suculentas, mais reconhecidamente aquelas pertencentes ao grupo das Crassuláceas, apresentam um tipo de metabolismo do gás carbônico que se caracteriza por uma inversão nas trocas daquele gás. Durante o período diurno, elas podem, até mesmo, eliminar  $\text{CO}_2$ , absorvendo-o durante o período noturno. Esta fixação e acumulação de  $\text{CO}_2$  no escuro é conhecida na literatura como "efeito de De Saussure".

Inúmeros autores têm procurado esclarecer o mecanismo pelo qual se processa tal fixação, bem como a utilização do  $\text{CO}_2$  assim assimilado durante o período luminoso seguinte.

O paralelismo observado entre as trocas de gás carbônico, as variações periódicas de acidez do suco celular e do conteúdo de malato neste, ao lado de outras indicações obtidas com o uso de  $C^{14}$ , fazem crer que o  $CO_2$  absorvido durante a noite seja fixado na forma de ácido málico, acumulando-se êste no vacúolo (7), (5), (8).

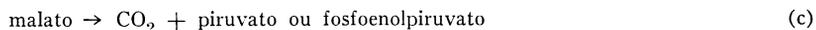
Vários mecanismos têm sido atribuídos a esta síntese de malatos no escuro. Entre êles o que parece ser mais aceito é o expresso na equação (a), catalizado pela carboxilase fosfoenolpirúvica.



Por atividade da dehidrogenase málica, o ácido oxaloacético resultante daria o ácido málico (b), sendo êste, então acumulado.



Quanto à utilização do malato no período claro, ocorreria inicialmente uma decarboxilação (c).



O resíduo de três carbonos seria, em seguida, oxidado através do ciclo de ácidos tricarbóxicos, dando mais 3  $CO_2$ , ou seria incorporado "em bloco" a carboidrato, seguindo o caminho inverso da glicólise. O  $CO_2$  produzido tanto num como noutro caso, seria utilizado também na síntese de carboidratos (7).

Êste tipo de metabolismo do  $CO_2$ , conhecido na literatura pela sigla CAM (Crassulacean Acid Metabolism) tem sido extensivamente estudado naquêlo grupo de plantas. Pouco se sabe, até mesmo de sua ocorrência, com respeito a plantas suculentas de alguns outros grupos.

Em um recente trabalho (1) tivemos a oportunidade de analisar o balanço hídrico de certas suculentas que vivem como epífitas ou ervas terrestres na mata pluvial das encostas da Serra do Mar. Pude-

mos observar que algumas delas, durante um período eventual de seca, mantiveram seus estômatos praticamente fechados durante grande parte do dia, evitando assim, perda de água por transpiração. Êste fato atraiu nossa atenção com respeito à possibilidade de tais plantas apresentarem o “efeito de De Saussure”, isto é, fixação e acumulação de  $\text{CO}_2$  à noite, quando as condições de umidade do ar podem ser mais elevadas. Tal fato representaria, ao nosso ver, mais um mecanismo auxiliar de defesa contra os perigos da seca a ser apresentado por aquelas plantas.

No presente trabalho, de natureza puramente qualitativa, procuramos investigar, em algumas epífitas e erbáceas terrestres da mata pluvial, a ocorrência daquêle efeito mencionado.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material por nós utilizado no presente trabalho compreende onze espécies de plantas epífitas ou erbáceas terrestres que ocorrem nas matas pluviais costeiras do Estado de São Paulo. Todo o material vegetal empregado proveio de exemplares cultivados em nossas estufas.

Dentre as bromeliáceas, foram investigadas as seguintes espécies: *Aechmea pectinata* Bak., *Billbergia amoena* (Lodd.) Ldl., *Caniistrum cyathiforme* (Vell.) Mez, *Neoregelia concentrica* (Vell.) L. B. Smith, *Quesnelia testudo* Lindm., *Vriesia inflata* (Wawra) Wawra.

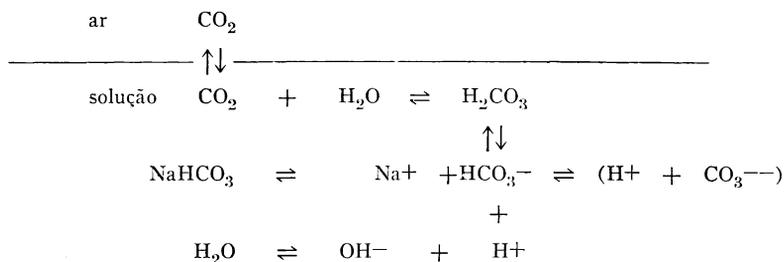
Apenas duas espécies representaram a família das orquidáceas: *Epidendrum ellipticum* Grah. e *Maxillaria picta* Hook. Além destas espécies, estudamos ainda *Codonanthe gracilis* (Mart.) Hnst., *Hypocyrtia radicans* Kl. et Hnst. e *Nematanthus fritschii* Hoehne, representantes da família das gesneráceas.

A escolha de tais espécies deveu-se apenas à sua existência em nossas estufas, à sua fácil identificação taxonômica, uma vez que já dispúnhamos de material classificado em nossos herbários, e ao fato de algumas delas já terem sido estudadas por nós quanto aos seus balanços hídricos.

Para a verificação da ocorrência de fixação noturna de  $\text{CO}_2$  nas espécies acima relacionadas, utilizamo-nos do método colorimétrico

de Kauko (2, cit. por Lieth 3), empregado por êle e, posteriormente, por outros autores, para determinações quantitativas de gás carbônico.

Êste método baseia-se fundamentalmente no fato de que uma solução aquosa contendo 84 mg/lit. de  $\text{NaHCO}_3$  (0,001N) e 7,46 g/lit. de  $\text{KCl}$  (0,099N) se mantém em equilíbrio com o teor de  $\text{CO}_2$  da atmosfera que com ela esteja em contacto. Um aumento ou diminuição dêste teor no ar, provoca rapidamente uma semelhante modificação no teor de  $\text{CO}_2$  da solução, segundo a equação abaixo (cf Zeller 9), tendendo a uma situação de equilíbrio.



Isto tem como consequência variações de seu pH, aumentando-o ou diminuindo-o, conforme a atmosfera apresente teores menores ou maiores de  $\text{CO}_2$ . Utilizando-nos de um indicador como o vermelho de Cresol (pH 7,0 — 8,8) a 10 mg/lit., poderemos observar com bastante facilidade, variações mínimas no teor de gás carbônico do ar, graças às modificações de côr da solução. Quando aquêle teor diminui, a solução torna-se mais alcalina e adquire uma coloração púrpura; quando o teor de  $\text{CO}_2$  aumenta, a solução torna-se mais ácida e a sua coloração tende ao amarelo vivo.

Para o presente trabalho foram preparados diàriamente cêrca de 50 tubos de vidro (2 x 17,5 cm), contendo 4 ml da solução indicadora. Durante aproximadamente 8 horas êles permaneciam abertos, em contacto com a atmosfera, a fim de que entrassem todos em equilíbrio com o seu teor de  $\text{CO}_2$  e adquirissem uma coloração uniforme. Quando em equilíbrio com a concentração de  $\text{CO}_2$  do ar (geralmente ao redor de 0,03% vol. nas condições de nossas experiências) a solução adquire uma tonalidade rósea, indicando um pH 8,15 a 20°C. Às 18 horas, quando, na época em que realizamos o presente traba-

lho, a intensidade luminosa natural já se encontra bastante baixa (ao redor de 500 Lux), colocávamos em cada tubo uma ou mais fôlhas, ou partes delas, apoiadas sôbre uma pequena tela de nylon, conforme mostra o esquema da Fig. 1 e os fechávamos com uma rôlha de borracha. Eram preparados assim 10 lotes de 5 tubos, um para cada uma das espécies então investigadas. Dois ou três tubos eram deixados como contrôle, sem fôlha, a fim de que pudéssemos verificar, por comparação, as modificações de côr das soluções nos demais tubos.

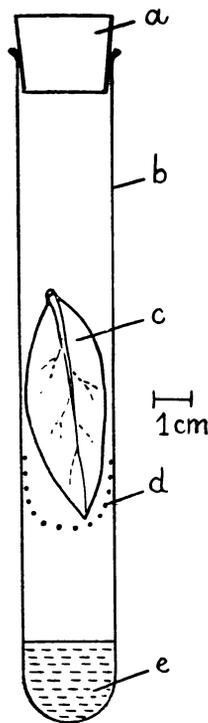


Fig. 1 — Representação esquemática de um tubo preparado para a realização do teste de fixação noturna de  $\text{CO}_2$ .  
a — rôlha de borracha, b — tubo de vidro, c — fôlha, d — tela de nylon, e — solução indicadora.

Logo após serem colhidas, as fôlhas eram colocadas entre papel de filtro umedecido, evitando-se, assim, que perdessem água por trans-

piração até o momento de sua colocação nos tubos. Só foram utilizadas folhas adultas, que se apresentassem em bom estado e que tivessem estado bem expostas à luz. É conhecido o fato de que, para a fixação noturna de  $\text{CO}_2$  uma das condições necessárias é que os órgãos assimiladores tenham recebido suficiente iluminação no período anterior (7), (5). As plantas cultivadas em nossas estufas e utilizadas neste trabalho, achavam-se expostas a uma intensidade luminosa de aproximadamente 30-40% da luz exterior. Antes que fossem introduzidas nos tubos, as folhas eram examinadas à lupa, a fim de que nos certificássemos da inexistência de epífilas, as quais poderiam afetar os resultados.

Nos casos de espécies com folhas grandes, eram cortados fragmentos de aproximadamente  $5 \text{ cm}^2$ , sempre que possível ao longo das nervuras, procurando-se com isso afetar ao mínimo os tecidos vivos. O fato de usarmos folhas destacadas ou mesmo fragmentos do limbo não deve afetar fundamentalmente os resultados; tal técnica é normalmente usada para estudos do metabolismo de Crassuláceas (7) ou para estudos que envolvam trocas de  $\text{CO}_2$  entre folha e atmosfera (4). Pucher e col. (6 cit. 7) relatam mesmo que as modificações quantitativas em compostos orgânicos em *Bryophyllum calycinum* exposto à luz ou ao escuro, foram semelhantes caso se usassem folhas destacadas ou não.

Em *Neoregelia concentrica* e *Aechmea pectinata*, os exemplares que existiam em nossas estufas já se apresentavam em fase final de frutificação, razão por que acreditamos que suas folhas, embora morfológicamente perfeitas, já apresentassem um certo grau de senescência.

Uma vez montados os tubos (18 horas), eram feitas observações das modificações de cor das soluções às 21, 24 e 6 horas da manhã. As necessidades de oxigênio para a fixação de  $\text{CO}_2$  no escuro parecem ter sido supridas, uma vez que, relativamente ao volume do tubo, utilizávamos pouco material vegetal. Por outro lado, as plantas que às 21 horas indicavam ter absorvido  $\text{CO}_2$ , assim continuavam a fazê-lo até a observação das 6 horas.

A diminuição do teor de  $\text{CO}_2$  no interior dos tubos por efeito de assimilação não representa qualquer obstáculo, pois, mesmo em ar desprovido daquêle gás, plantas com "efeito de De Saussure" con-

tinuaram a apresentá-lo (5). Por outro lado não estamos interessados aqui em determinar quantitativamente o  $\text{CO}_2$  absorvido, mas apenas em constatar se ocorre ou não sua fixação à noite.

Quanto à temperatura reinante durante as experiências, o gráfico da Fig. 2 ilustra muito bem o tipo de curva diária de temperatura então verificada. Em tôdas as noites em que trabalhamos, a temperatura ambiente esteve sempre abaixo de  $20^\circ\text{C}$ , oscilando entre êste valor e  $12\text{-}13^\circ\text{C}$ . Na literatura há informações de que, em temperaturas mais baixas que  $20^\circ\text{C}$  a acidificação do suco celular, conseqüência da fixação noturna, se torna mais intensa (7).

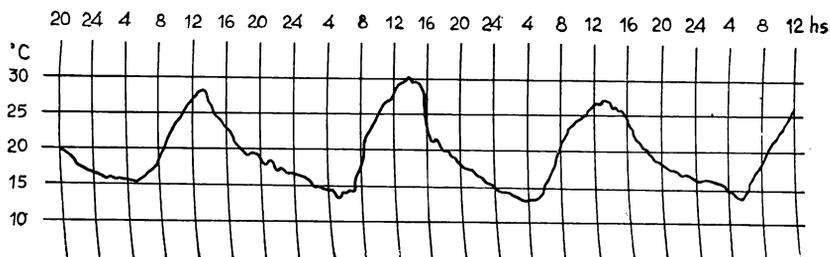


Fig. 2 — Andamento diário da temperatura em alguns dos dias em que foram realizadas as experiências (maio de 1963).

Para cada espécie estudada foram realizados mais de 50 testes, distribuídos em noites diversas. Os tubos permaneceram sempre em condições de céu aberto, expostos às temperaturas ambientes.

A estrutura das fôlhas, de espécies cuja anatomia foliar ainda não havia sido estudada por nós, foi também investigada, utilizando-nos, para isso, dos métodos usuais em microscopia.

## RESULTADOS

### a) *Anatomia*

Uma das condições necessárias, mas não suficiente, para a ocorrência do “efeito de De Saussure” é a suculência do órgão assimilador. Associada a esta suculência é indispensável, ainda, a presença de clorofila. Órgãos ou tecidos suculentos desprovidos de clorofila não mostram aquêle efeito (5).

Das onze espécies investigadas apenas quatro não tinham sido estudadas quanto à estrutura foliar: *Neoregelia concentrica*, *Aechmea pectinata*, *Quesnelia testudo* e *Canistrum cyathiforme*. A anatomia das folhas das demais espécies já se acha publicada em nosso trabalho anterior (1).

As figuras 3 a 6 representam cortes transversais ao limbo foliar de cada uma das quatro espécies adrede mencionadas.

Como se pode observar, as estruturas das folhas das bromeliáceas aqui estudadas são bastante uniformes e semelhantes. Apenas no caso de *Vriesia inflata* (1) observamos a quase total ausência de suculência. As demais mostram-na em maior ou menor grau, e uma distribuição de clorofila por quase todo o mesófilo.

Entre as orquídeas, *Maxillaria picta* não apresenta suculência, enquanto que em *Epidendrum ellipticum* ela é bem nítida (1). Em ambas o parênquima clorofiliano é difuso por todo o mesófilo, não se distinguindo palissadas.

As estruturas apresentadas pelas três gesneráceas *Codonanthe gracilis*, *Hypocyrtia radicans* e *Nemathanthus fritschii*, são bem uniformes (1). O parênquima aquífero que lhes confere suculência é aclo-rofilado, distinguindo-se nitidamente dos parênquimas palissádico e lacunoso.

#### b) *Fixação e acumulação noturnas de CO<sub>2</sub>*

As observações de fixação e acumulação de CO<sub>2</sub> durante a noite pelo método colorimétrico, mostraram que, das onze espécies investigadas, seis deram resultados positivos. As outras cinco, em nenhum dos 250 testes realizados com elas indicaram qualquer assimilação no escuro. Os resultados porcentuais dos testes realizados acham-se expressos na Tabela 1.

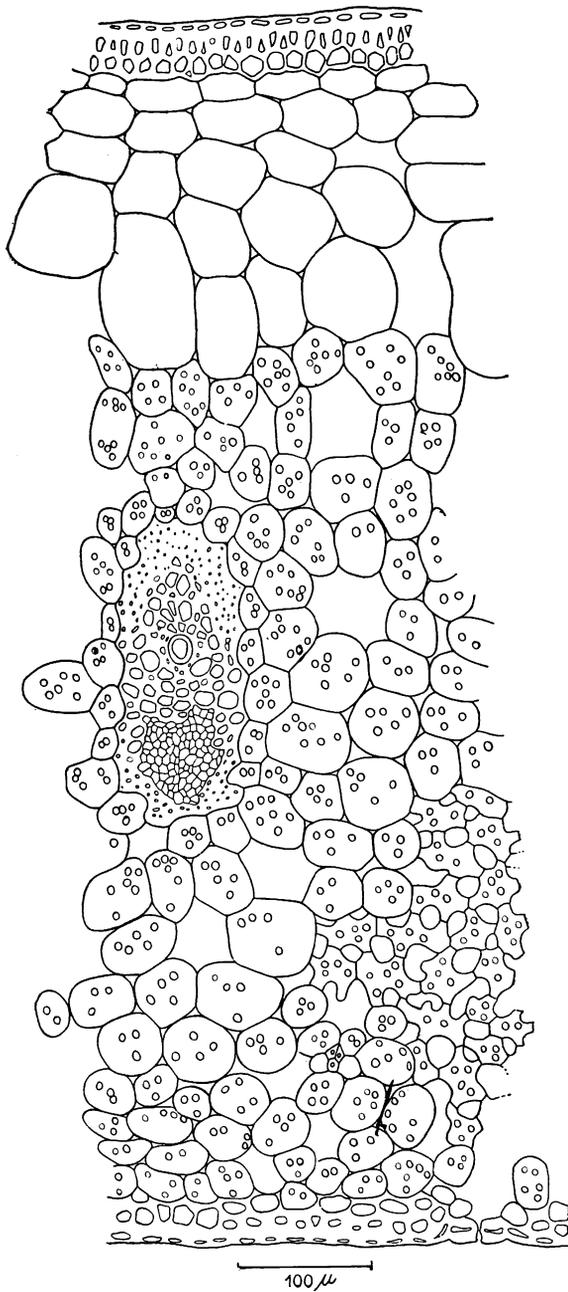


Fig. 3 — Seção transversal da folha de *Aechmea pectinata*.

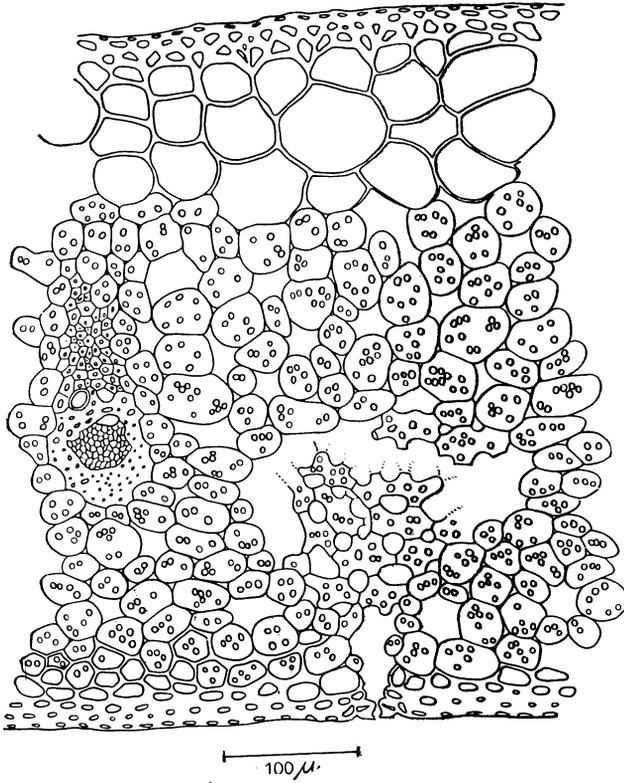


Fig. 4 — Secção transversal da fôlha de *Canistrum cyathiforme*.

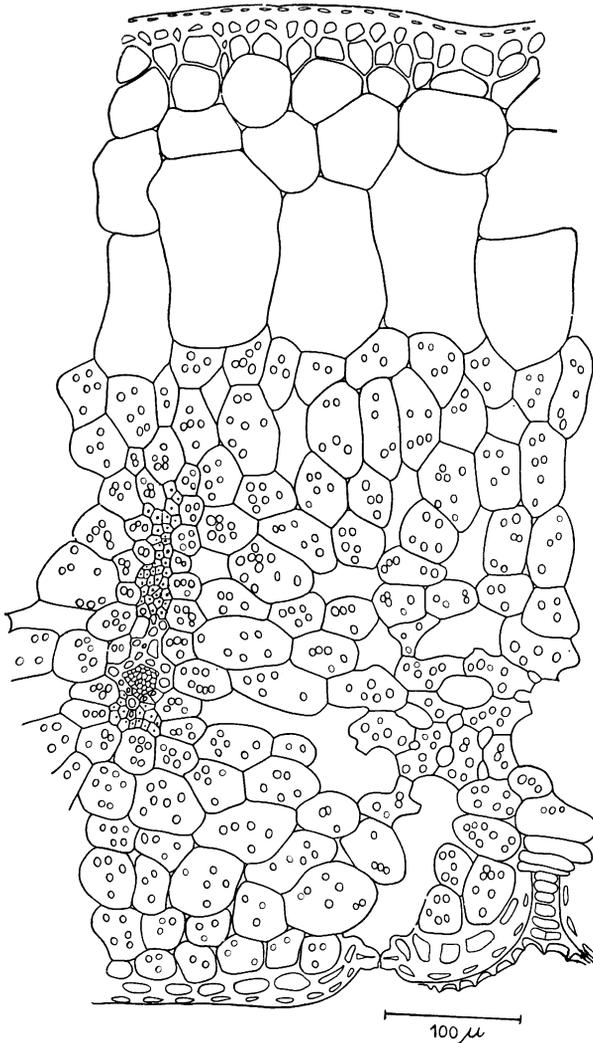


Fig. 5 — Secção transversal da fôlha de *Neoregelia concentrica*.

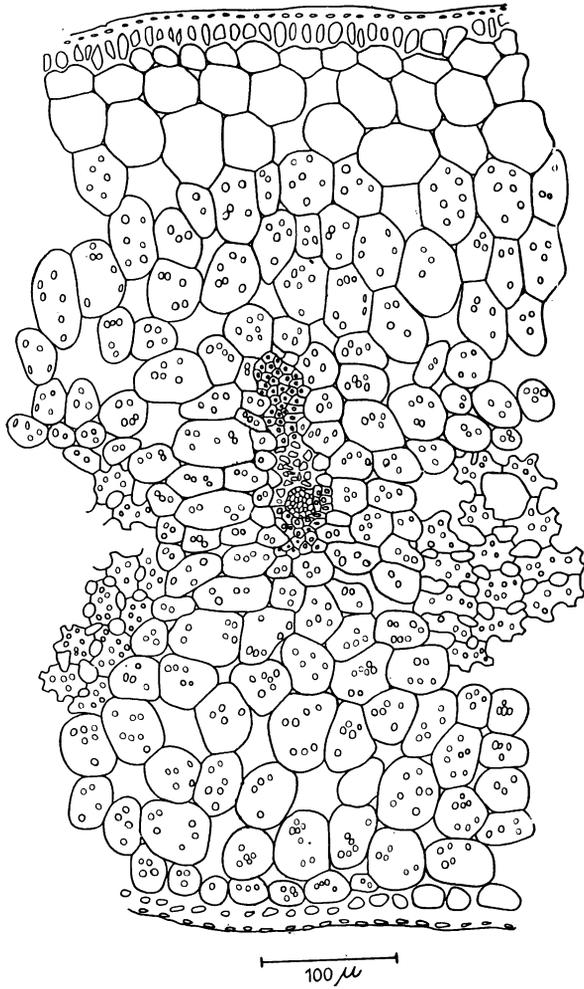


Fig. 6 — Secção transversal da fôlha de *Quesnelia testudo*.

Tab. 1 — Resultados percentuais dos testes realizados sobre fixação e acumulação noturna de CO<sub>2</sub>

Espécies	Família	Sinúsia	Acumul. Not.	
			% +	% —
<i>Aechmea pectinata</i>	Bromel.	epífita	78,9	21,1
<i>Billbergia amoena</i>	"	er. ter.	100,0	0,0
<i>Canistrum cyathiforme</i>	"	er. ter.	100,0	0,0
<i>Neoregelia concentrica</i>	"	epífita	85,1	14,9
<i>Quesnelia testudo</i>	"	er. ter.	94,8	5,2
<i>Vriesia inflata</i>	"	epífita	0,0	100,0
<i>Epidendrum ellipticum</i>	Orchid.	er. ter.	100,0	0,0
<i>Maxillaria picta</i>	"	epífita	0,0	100,0
<i>Codonanthe gracilis</i>	Gesner.	epífita	0,0	100,0
<i>Hypocyrtia radicans</i>	"	epífita	0,0	100,0
<i>Nematanthus fritschii</i>	"	epífita	0,0	100,0

Pode-se observar que em *Billbergia amoena*, *Canistrum cyathiforme* e *Epidendrum ellipticum* 100% dos testes indicaram fixação positiva de CO<sub>2</sub> à noite. Nos casos de *Aechmea pectinata*, *Neoregelia concentrica* e *Quesnelia testudo*, uma certa porcentagem dos testes deu resultados negativos, particularmente significantes nas duas primeiras espécies. Podemos atribuir isto ao mau estado fisiológico de um ou outro segmento de folha utilizado ou à incipiente senescência de alguns indivíduos. A alta porcentagem de resultados positivos obtidos com estas espécies assegura-nos, sem dúvida, que elas têm a capacidade de fixar e acumular CO<sub>2</sub> à noite.

Em nossas experiências noturnas a determinação das espécies com "efeito de De Saussure" podia ser feita ao redor das 21 horas, pois, já então, a solução indicadora mostrava, para tais espécies, valores de pH próximos a 8,8. Em tais casos a solução tomava uma coloração intensamente púrpura. Naquelas espécies sem fixação noturna a coloração amarelada da solução indicadora demonstrava ter havido apenas respiração, com conseqüente eliminação de CO<sub>2</sub> pela folha no interior do tubo.

Nas observações seguintes, às 24 e 6 horas, o quadro apresentado anteriormente não se modificava, a não ser acentuando cada vez mais a diferença de coloração, para pH mais básicos ou ácidos, em

relação ao controle. Desta forma, às 6 horas, ao término da experiência, era perfeitamente possível distinguir os tubos cujo material fixou  $\text{CO}_2$  daqueles onde tal não ocorreu.

### CONCLUSÕES

Os resultados experimentalmente obtidos demonstram que certas espécies suculentas, epífitas ou erbáceas terrestres, da mata pluvial, têm a capacidade de fixar e acumular  $\text{CO}_2$  durante o período noturno. Que papel tal capacidade poderia representar para estas espécies, podemos deduzir das observações que se seguem.

A absorção diurna de  $\text{CO}_2$  normalmente acarreta para as plantas um certo prejuízo no que se refere ao seu balanço hídrico; a abertura dos estômatos durante o dia, a fim de permitir a entrada do  $\text{CO}_2$  possibilita concomitantemente a perda de vapor d'água pela fôlha, isto é, a transpiração. Se as condições de abastecimento hídrico à planta forem precárias, o que pode ocorrer durante períodos de menor pluviosidade, a transpiração não recompensada por uma equivalente absorção poderá provocar o dessecação dos órgãos e finalmente sua morte. As plantas homeohídricas, particularmente aquelas hidroestáveis, dispõem de adaptações que lhes permitem economizar água, impedindo assim que seu balanço hídrico se torne negativo. Tão logo o déficit de saturação de seus tecidos comece a se acentuar, cerram seus estômatos, reduzindo a transpiração.

Analisando o balanço d'água de plantas da mata pluvial durante períodos eventuais de seca, tivemos o ensejo de observar que algumas epífitas e erbáceas terrestres mantinham seus estômatos praticamente fechados por grande parte do dia (1).

Este mecanismo de defesa contra a seca, se de um lado traz benefícios, no sentido de possibilitar a economia hídrica, de outro tem a desvantagem de impedir que o indivíduo absorva  $\text{CO}_2$  para a fotossíntese. A associação deste mecanismo à capacidade de fixar e acumular  $\text{CO}_2$  à noite representaria, por certo, a solução ideal. No período noturno as condições de umidade do ar podem ser mais favoráveis, não possibilitando razões de transpiração tão acentuadas a ponto de poderem ocasionar alterações negativas no balanço hídrico das plantas. A absorção de  $\text{CO}_2$  nestas horas não teria necessariamente que

pagar um grande tributo em água transpirada. Durante o dia, mesmo mantendo seus estômatos fechados, a planta teria a seu dispor o  $\text{CO}_2$  necessário à fotossíntese, desde que a fixação noturna tivesse sido eficiente.

Os resultados aqui apresentados vêm demonstrar que tal associação existe em algumas epífitas e erbáceas terrestres da mata. O aspecto negativo decorrente de seu comportamento em relação à economia hídrica pode, pois, ser anulado, em vista da capacidade que tais plantas possuem de fixar  $\text{CO}_2$  à noite.

A ocorrência do “efeito de De Saussure” em tais espécies representa para elas, sem dúvida alguma, mais um mecanismo auxiliar, paralelo, de economia de suas disponibilidades hídricas.

Quanto à estrutura foliar, nossos dados parecem apoiar observações de outros autores de que a assimilação noturna de  $\text{CO}_2$  dependa, entre outros fatores, da existência de tecidos suculentos aos quais esteja associado o caráter clorofiliano. Naquelas espécies por nós estudadas, onde os tecidos suculentos eram aclorofilados, não pudemos observar o “efeito de De Saussure”.

Finalmente queremos lembrar aqui que muito poucas informações existem hoje a respeito de fixação noturna de  $\text{CO}_2$  por plantas suculentas de grupos como o das bromeliáceas, orquidáceas, gesneráceas e outros, particularmente do ponto de vista bioquímico, o que seria, sem dúvida alguma, altamente desejável.

#### SUMMARY

In the present paper the author describes some experiments planned for the detection of night fixation of  $\text{CO}_2$  in some epiphytes and ground herbs which live in the rain forest. A previous paper showed that some of those plants can keep the stomata closed during the whole day.

The method employed was a very simple colorimetric one. This method is based on pH alterations of a certain solution, caused by the leaves through changes of  $\text{CO}_2$  concentration in the air which is in contact with that solution. Of eleven species investigated, six were able to fix and accumulate  $\text{CO}_2$  during the night.

The author discusses the possible ecological significance that this adaptation can have in relation to the water balance of those species.

### 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 aquisição de drogas e instrumentos utilizados na presente pesquisa.

Ao Sr. Oswaldo Handro devemos a identificação das espécies aqui investigadas.

À Sra. Else G. Kalmus e Srta. Maria José Guimarães agradecemos sua valiosa cooperação na realização deste trabalho.

### BIBLIOGRAFIA

- 1 — COUTINHO, L. M. — 1962 — Contribuição ao conhecimento da ecologia da mata pluvial tropical. Bol. Fac. Fil. Ciên. Letr. Univ. S. Paulo N.º 257, Botânica 18: 1-219.
- 2 — KAUKO, Y. — 1934 — Mathematische und graphische Behandlung des Gleichgewichtes Base-Kohlensäure-Wasser bei den verdünnten Lösungen. Ann. Acad. Sci. fenn. A 39: 1-83.
- 3 — LIETH, H. — 1958 — Grenzen und Anwendungsmöglichkeiten der colorimetrischen CO<sub>2</sub> — Bestimmung. Planta, 51: 705-721.
- 4 — LIETH, H. — 1959 — Über den Lichtkompensationspunkt der Landpflanzen. Planta, 54: 530-576.
- 5 — NUERNBERGK, E. L. — 1961 — Endogener Rythmus und CO<sub>2</sub> — Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalem Säurerythmus. Planta, 56: 28-70.
- 6 — PUCHER, G. W., C. S. LEAVENWORTH, W. D. GINTER and H. B. VICKERY — 1947 — Studies in the metabolism of Crassulacean plants: the behavior of excised leaves of *Bryophyllum calycinum* during culture in water. Plant Physiology, 23: 477-493.
- 7 — RANSON, S. L. and M. THOMAS — 1960 — Crassulacean Acid Metabolism. Ann. Rev. of Plant Physiology 11: 81-119.
- 8 — SALTMAN, P., G. KUNITAKE, H. SPOLTER and C. STITTS — 1956 The Dark Fixation of CO<sub>2</sub> by Succulent Leaves: The First Products. Plant Physiology 31 (6): 464-468.
- 9 — ZELLER, O. — 1951 — Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. Planta, 39: 500-526.