

# **Estruturas silicosas na gramínea *Panicum maximum***

**PEDRO FONTANA JR. \* e HANS MUTH \*\***

Instituto Oswaldo Cruz

A presença de silício em vegetais vem sendo assinalada e estudada desde muito tempo na literatura científica. Um dos primeiros a tratar do assunto foi o botânico DE SAUSSURE (5) no seu livro "Recherches chimiques sur la végétation" publicado pela primeira vez em Leipzig — 1804 (Ed. A. Wieler). Neste livro há todo um capítulo sobre as cinzas vegetais, onde se estuda, com numerosas determinações de sílica em várias espécies, a importância do silício na nutrição mineral das plantas.

Quem, pela primeira vez, admitiu a hipótese da existência de compostos orgânicos de silício foi LADENBUR (18); no entanto, o trabalho realmente clássico neste domínio foi o realizado por BERTHELOT e ANDRÉ (3), que estudaram as diferentes proporções de sílica solúvel, durante o ciclo vital do trigo, nas seguintes condições:

1. Em meio ácido.
2. Em meio alcalino.
3. Em meio neutro.

Cada uma destas determinações era feita a quente ou a frio.

O trabalho realizado por êsses dois pesquisadores foi exaustivo, iniciando em determinações de sílica no solo e nas sementes, antes da semeadura. Em seguida, foram feitas determinações nas diferentes partes da planta, em vários estágios de crescimento, terminando com determinações nas novas sementes, obedecendo sempre às condições iniciais de meio ácido, meio alcalino, meio neutro, a quente e a frio.

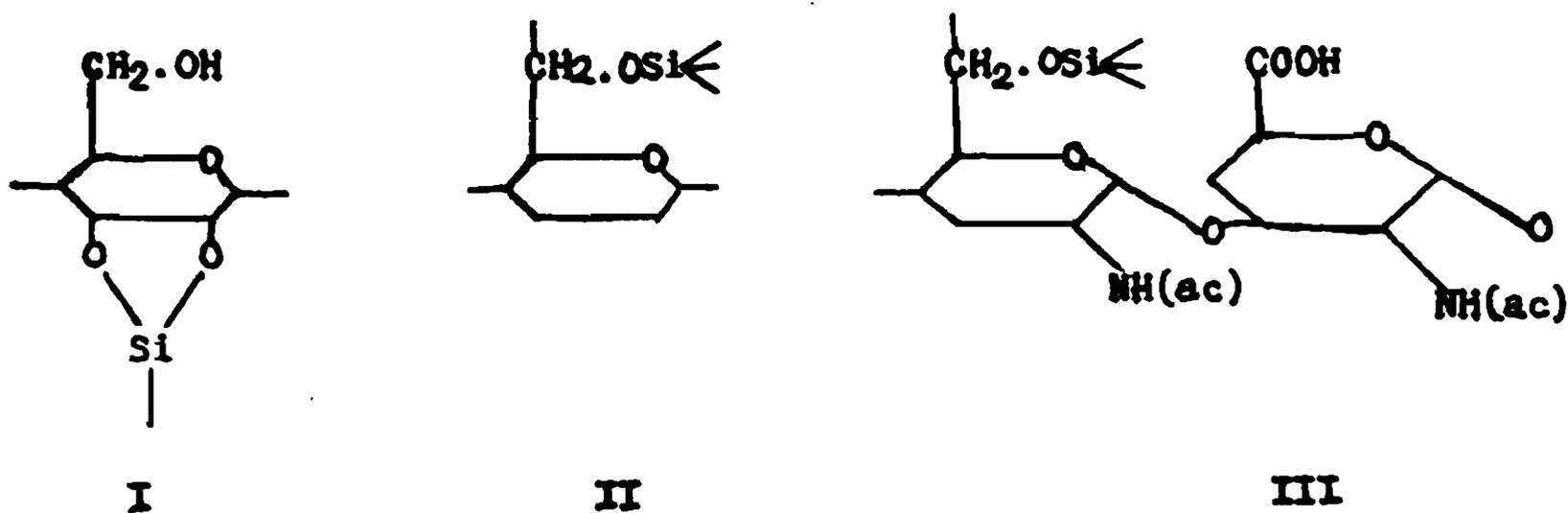
Verificaram BERTHELOT e ANDRÉ o aumento progressivo de sílica solúvel, durante o ciclo vital da planta, o que vem a favor da hipótese da formação de compostos orgânicos contendo silício. Recentemente esta hipótese vem encontrando apóio no trabalho de vários pesquisadores. Foram isolados por ENGEL (6) compostos orgânicos de silício que foram identificados como complexos de galactose e silício (Galaktose-Silicium-complexe) e HOLZAPFEL (15) isolou também vários compostos orgânicos de silício propondo 3 esquemas para a estrutura dos ésteres obtidos;

---

\* Laboratório de Bioquímica do I.O.C.

\*\* Laboratório de Microscopia Eletrônica do I.O.C.

Recebido para publicação em 3 de dezembro de 1956.



entretanto, estas estruturas moleculares não estão ainda definitivamente estabelecidas.

Para não nos alongarmos, podemos indicar a bibliografia sobre o papel do silício nos vegetais, que se encontra no livro clássico de CZAPEC (4), bem como uma bibliografia mais moderna e atualizada, que pode ser encontrada no trabalho de ENGEL (6).

No que se refere apenas à anatomia das gramíneas, podemos indicar os trabalhos de ARTSCHWAGER (1) (2), HEINEMANN (12), GROB (11), FROHMEYER (10) e KÜSTER (17).

No presente trabalho procuramos apenas estudar a morfologia e a estrutura microscópica das espículas silicosas, que formam verdadeiros sílico-esqueletos nas diferentes partes da planta, semelhantes ao sílico-esqueleto observado nas diatomáceas.

O mecanismo de deposição de sílica nos vegetais ainda não está suficientemente esclarecido. Um dos autores do presente trabalho tem se dedicado a este aspecto do problema, concluindo que o mecanismo é provavelmente de natureza enzimática (7). De um certo modo, este ponto de vista parece se confirmar com as conclusões de LEWIN (19), que trabalhou com culturas de diatomáceas e verificou influência de várias substâncias contendo enxofre reduzido (grupamentos SH), sobre a utilização da sílica pela diatomácea.

#### Material e métodos:

O material por nós escolhido para iniciarmos os estudos sobre a importância da sílica nos vegetais foi a gramínea *P. maximum*, que além de ser abundante em toda região do D. Federal, pode ser facilmente cultivada em culturas hidropônicas, de tal maneira que podemos variar a concentração de silicato disponível e verificar o efeito desta variação sobre as espículas de sílica.

Para obter as espículas de sílica para exame microscópico empregamos uma técnica que é, em última análise, u'a modificação da técnica empregada por FREY-WYSSLING (9) e da empregada recentemente por HELMCKE (14).

De início, o material proveniente da gramínea é tratado pelo ácido sulfúrico a quente (como na mineração para a determinação do nitrogênio pelo método de KJELDAHL), usando como catalisador a água oxigenada.

Depois de eliminada a matéria orgânica, o resíduo foi lavado várias vezes com  $\text{HNO}_3$  diluído e com  $\text{HCl}$  diluído, sendo finalmente lavado com água destilada.

Monta-se o material obtido sobre a grade porta-objeto, previamente coberta por uma membrana de colódio. O material está, desta forma, pronto para ser submetido ao exame no microscópio de contraste de fase e no microscópio eletrônico.

Depois de examinado pelas duas técnicas microscópicas acima referidas, foram escolhidos os aspectos mais interessantes dos quais tomamos numerosas fotografias. Desta maneira pudemos observar algumas formações já descritas por HELMCKE (13) (14) nas diatomáceas, bem como outras formações que só se apresentam nas gramíneas.

Em alguns casos entretanto, dada a espessura da camada silicosa, torna-se difícil a evidenciação de detalhes de estrutura com esta técnica e fomos obrigados a recorrer a outros artifícios técnicos para poder observar estes detalhes de estrutura.

A técnica adotada para este fim foi a das réplicas de benzeno ou naftaleno carbonizados feitas sobre o material a examinar, recomendada por KOENIG e HELLWIG (16). O material é colocado sobre a grade porta-objeto (já dotada de uma membrana de colódio) e levado à câmara de vácuo onde se procede a sua cobertura por uma camada de negro de fumo produzido pela vaporização e carbonização de naftaleno ou benzeno por bombardeio eletrônico.

Combinamos esta técnica com a de sombreamento pelo  $\text{PtO}_2$ , metalizando o material, antes de ser submetido à carbonização, com uma camada de  $\text{PtO}_2$ , aplicada sob um ângulo de  $20^\circ$ .

Terminada a operação de sombreamento e a de carbonização, o material, sempre sobre a membrana de colódio, deve ser tratado pelo  $\text{HF}$  (48,51%), que dissolve, em poucos minutos, a camada de sílica, restando então apenas a réplica do material carbonizado que pode evidenciar os detalhes da estrutura da superfície das espículas.

## RESULTADOS

Do exame das espículas obtidas, o processo da mineralização dos componentes orgânicos resultou ser o melhor para o estudo e descrição do revestimento silicoso nos vegetais.

As espículas da borda das folhas, em forma de espinho, já têm sido bem estudadas, por isso nelas não nos detemos; parece tratar-se de modificações do revestimento das células da borda. Entretanto, admittem alguns ter observado elementos figurados de protoplasma no interior da cavidade que se pode notar no interior de cada espinho. (Estampa I, a e b)

Na Est. I (c, d), vê-se um conjunto de espículas do limbo (c) e da nervura central (d) da fôlha que apresentamos para dar uma idéia da posição relativa e da abundância das incrustações de sílica. Chamamos a atenção para o caráter generalizado do revestimento silicoso que se apresenta até em elementos bastante diferenciados como os estômatos, que serão vistos com maiores detalhes na fig. 8 e para as chamadas células de sílica que poderão também ser melhor observadas na Est. II (e, f, g e h)

Observando-se a estrutura das incrustações da Est. I (e), que constituem o esqueleto silicoso da fôlha, teremos uma visão de quase todos os tipos de espícula. Nas fotografias obtidas com maior aumento (Est. I f, g) e com auxílio da técnica de réplica podemos ver como as células se articulam umas nas outras (fig. 3 d, e).

Comparando as formações encontradas na fôlha, com as encontradas na gluma (bráctea protetora das espiguihas das gramíneas), vemos na Est. II (a, b, c, d), que a estrutura da gluma, se bem que de aspecto diferente, apresenta um sistema homólogo de articulações entre os elementos celulares.

Verificamos também a existência de estruturas semelhantes à "Schaumstruktur" descrita por HELMCKE (13) nas diatomáceas, se bem que a estrutura observada por nós apresenta elementos com poros de maior diâmetro. HELMCKE (13) atribui a esta estrutura a maior importância, admitindo mesmo que ela pudesse ter um papel de membrana seletiva. Est. II (i, j, k)

O Dr. MANEKE, do Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, mediu, a pedido de HELMCKE, a diferença de potencial desta "Schaumstruktur", encontrando valores da ordem de 3 mV, na sol. de NaOH 0.001 N. (13).

As "células de sílica" Est. II (e, f, g, h), cuja função ainda não está esclarecida, apresentam uma estrutura silicosa muito peculiar e podemos dizer que são células bastante diferenciadas. Pelo seu número e pela sua diferenciação, podemos supor que elas representam um relevante papel no metabolismo de sílica destas gramíneas. Podemos ver também na Est. II, f, b, a chamada "célula de cortiça", que sempre acompanha a "célula de sílica".

A placa interior que se pode observar na Est. II, g, prêsá apenas por duas hastes laterais, apresenta uma estrutura membranosa que podemos videnciar examinando a fotografia da Est. II, h, obtida pela técnica de réplica.

Os estômatos apresentam também uma estrutura silicosa, se bem que um revestimento menos espêsso. Na Est. II, l, vemos um fragmento de espículas apresentando o revestimento silicoso de um estômato e na Est. II, m, vemos o mesmo revestimento em fotografia obtida pela técnica de réplica, no microscópio eletrônico.

Na raiz, o que melhor se observa, é o contraste entre suas espículas lisas e retilíneas com as espículas em ondulação, observadas na fôlha e na gluma, Est. II, n. Nas fotografias com a técnica de sombreamento e réplica podemos ver (Est. II, o, p), os fragmentos de sílica no processo de adsorção e absorção de sílica. O processo de absorção de sílica foi estudado por FERRARI (8), entretanto, achamos que êste processo está longe de ter o seu mecanismo devidamente esclarecido.

Terminando a apresentação dêste estudo, sôbre a estrutura das espículas silicosas na gramínea *Panicum maximum*, podemos dizer que, a quantidade e a ocorrência de deposição de sílica em tão grande número de células, reflete, certamente, a importância que devem representar nas funções celulares dêsses vegetais.

\* \*

Um dos autores (P.F. JR.) teve o auxílio do C.N.Pq. para a realização do presente trabalho.

#### SUMMARY

The silica structure of the grass *Panicum maximum* were studied by electron and phase contrast microscopy. Several interesting kinds of silica formation (spiklets) were found.

The most interesting structures resembles the "Schaumstruktur" found by HELMCKE in diatoms.

Another interesting structure was described in the "silica cells" and a detailed study of the morphology of some different kinds of spiklets was made.

#### BIBLIOGRAFIA

- ( 1) ARTSCHWAGER, E. (1930) A comparative study of the stem epidermis of certain sugarcane varieties. Journ. Agr. Res., 41: 853-865
- ( 2) ARTSCHWAGER, E., (1940) Morphology of vegetative organs of sugarcane. Journ. Agr. Res., 60: 503-549
- ( 3) BERTHELOT, M. e ANDRÉ, M. (1899) in "Chimie Végétale et Agricole" Tome III: 39-59 Paris — Masson
- ( 4) CZAPEC, F., (1925) Biochemie der Pflanzen 1. Bd. S. 357 e 449 2. Bd. S 516-517 (Iena —) — Gustav Fischer (1922-1925)
- ( 5) DE SAUSSURE, TH., (1804) "Chemische Untersuchungen ueber die Vegetation" 2. Heft S. 75-77 Leipzig — Engelmann — (1890) Tradução do original: "Recherches chimiques sur la végétation" Leipzig — A. Wieler (1804)
- ( 6) ENGEL, W., (1935) Untersuchungen ueber die Kieselsaeureverbindungen im Roggenhalm. Planta, 41: 358-390.
- ( 7) FONTANA JR., P., (1954) Studies on the deposition of silica on the leaves of the grass "Panicum maximum". Rev. Brasil. Biol., 14 (1): 35-40. (Apresentado na 4.<sup>a</sup> Reunião Anual da Soc. Brasil. Progr. da Ciência em 1952 — Curitiba.)

- ( 8) FERRARI, C., (1949) Assorbimento del'ácido silícico per le radice. Boll. sci. facoltá chim. Uni. Bologna, 7: 23-25.
- ( 9) FREY-WYSSLING, W. in Plant Biochemistry (1952) Bonner, W. pg. 78. New York.
- (10) FROHMEYER, M. (1914) Die Entstehung und Ausbildung der Kieselzellen bei den Gramineen. Biblioth. Bot., 21 (86): 1-41
- (11) GROB, A., (1896) Beitrage zur Anatomie der Epidermis der Gramineenblätter. Biblioth. Bot., 7 (36): 1-122.
- (12) EINEMANN, K., (1925) Zur Kenntnis der Oberhaut am Maistengel. Bot. Centbl. Beihefte 42: 111-159
- (13) HELMCKE, J.G., (1954) Die Feinstruktur der Kieselsäure und ihre physiologische Bedeutung in Diatomeenschalen. Naturwiss., 41 (11): 254-255.
- (14) HELMCKE, J.G. e KRIEGER, W., (1953-4) Atlas der Diatomeenschalen in Elektronenmikroskop Bild. Wilmersdorf — Photo — Berlin.
- (15) HOLZAPFEL, L., (1951) Siliziumverbindungen in biologischen System. Zeit. Elektrochemie, 55: 577-580.
- (16) KOENIG H. e HELLWIG, G. (1951) Ueber dünne aus Kohlenwasserstoffen durch Elektronen oder Ionenbeschuss gebildete Schichten. Zeit. f. Physik, 129: 491-503
- (17) KÜSTER, E., (1951) Die Pflanzenzelle. Iena — Gustav Fischer
- (18) LADENBURG, A., (1872) Ueber die Natur den Pflanzen vorkommenden Siliciumverbindungen. Ber. dtsc. chem. Ges., 5: 568-569.
- (19) LEWIN, J.C., (1954) Evidence for the role of reduced sulfur compounds in silica utilization. J. Gen. Physiol., 37 (5): 589-599.

## EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

### ESTAMPA I

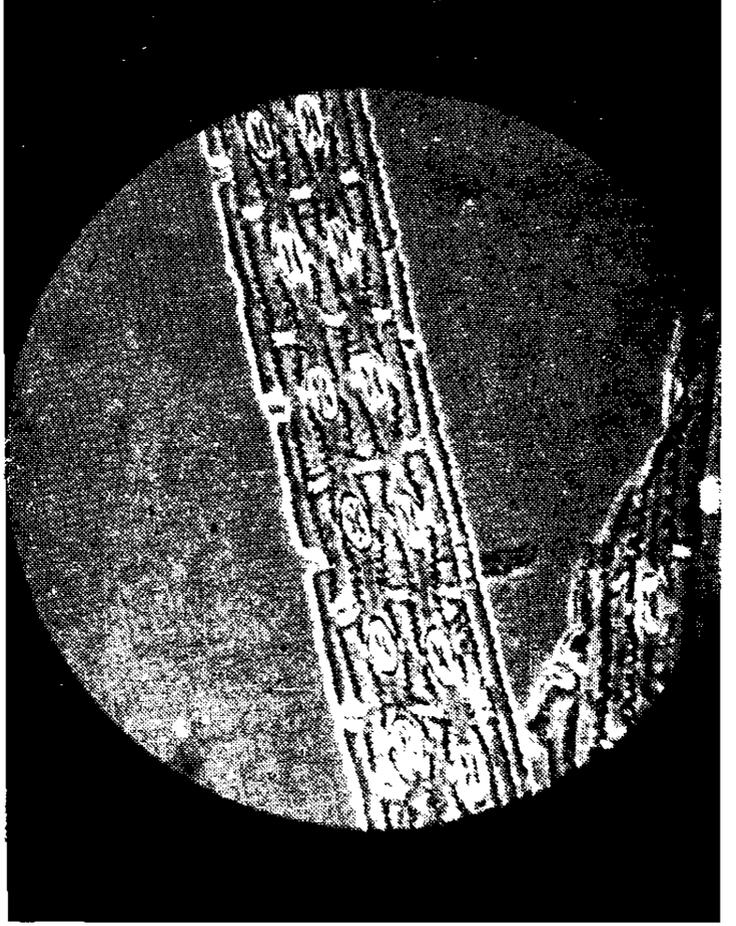
- a) Espículas das bordas das fôlhas com aumento de X48. (Microscópio de contraste de fase)
- b) As mesmas espículas com aumento de X155. (M. contraste de fase)
- c) Incrustações silicosas no limbo das fôlhas, com aumento de X155. Podemos notar o número de *células de sílica*. (M. contrast. fas.)
- d) Incrustações silicosas na nervura central com aumento de X155. Podemos observar bem a estrutura dos estômatos. (M. contrast. fas.)
- e) Fotografia com aumento de X 155, na qual podemos observar bem a estrutura silicosa da parede celular. (M. contrast. fas.)
- f) Fotografia da mesma estrutura com aumento de X1575. (Micoscópio eletrônico).
- g) Fotografia de uma ondulação isolada com aumento de X4780. (M. eletrônico).
- h) Fotografia da mesma estrutura com o auxílio da técnica de réplica. Aumento de X1575.
- i) Fotografia da mesma estrutura com o emprêgo da mesma técnica de (M. eletrônico).

## ESTAMPA II

- a) Fotografia com aumento de X155, mostrando um aspecto típico das formações silicosas da gluma, que deve ser comparada com as observadas na fôlha (Est. I, e).  
(M. contrast. fas.)
- b) Fotografia da mesma formação com aumento de X1575.  
(M. eletrônico).
- c) Fotografia da mesma estrutura com aumento de X3920.  
(M. eletrônico).
- d) Fotografia da mesma estrutura, obtida com o auxílio da técnica de réplica. Aumento X3920.  
(M. contrast. fas.)
- e) Incrustações silicosas de numerosas "células de sílica". Aumento de X155.  
(M. contrast. fas.)
- f) Fotografia de uma "célula de sílica" isolada, sem a placa interna. Pode-se ver a chamada "célula de cortiça" (cork cell) que sempre aparece acompanhado a "célula de sílica".  
Aumento de X1575. Foi usada para a obtenção desta fotografia a técnica de réplica.  
(M. eletrônico).
- g) "Célula de sílica" em fotografia obtida sem o uso da técnica de réplica. Pode-se ver bem, a placa interna presa à parede celular apenas por duas hastes.  
(M. eletrônico).
- h) *Placa interna* isolada, mostrando a estrutura membranosa de suas bordas. Fotografia obtida com o emprêgo da técnica de réplica. Aumento de X3920.  
(M. eletrônico).
- i) "Placa porosa" (Schaumstruktur?), observada com aumento de X1575.  
(M. eletrônico).
- j) "Placa porosa"\* com aumento de X3920.  
(M. eletrônico).
- k) Estrutura fina da "placa porosa". com aumento de X7200.  
(M. eletrônico).
- l) Revestimento silicoso dos estômatos. Aumento de X155.  
(M. contrast. fas.)
- m) Revestimento silicoso dos estômatos em fotografia obtida com o emprêgo da técnica de réplica. Aumento X1575.  
(M. eletrônico).
- n) Espículas silicosas das células da raiz. Nota-se bem a estrutura retilínea do revestimento da parede celular em contraste com revestimento em ondulação observado nas fôlhas. Aumento X155.  
(M. contrast. fas.)
- o) Estrutura da superfície das células da raiz em fotografia obtida por meio da técnica de réplica. Aumento de X1575.  
(M. eletrônico).
- p) Fotografia feita com a mesma técnica de réplica, porém, com um aumento de X3920.  
(M. eletrônico)



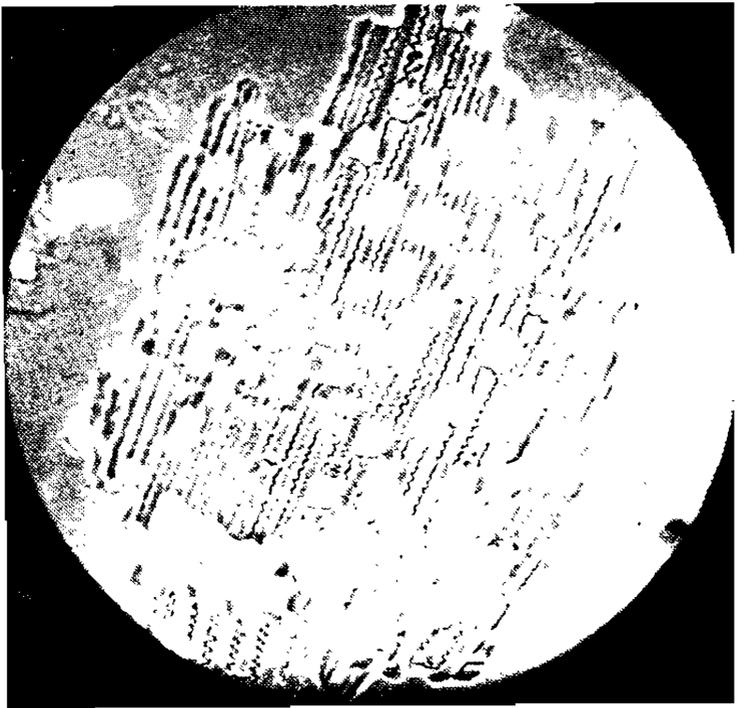
b



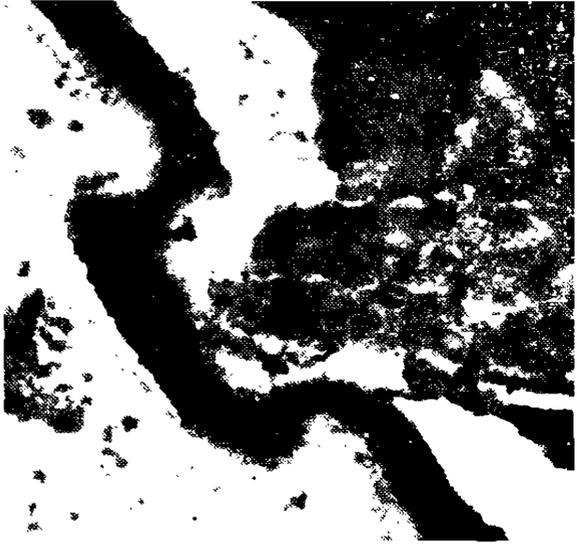
d



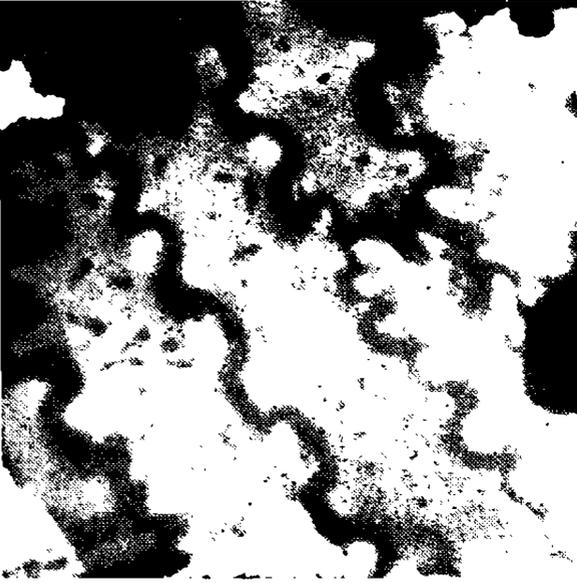
ii



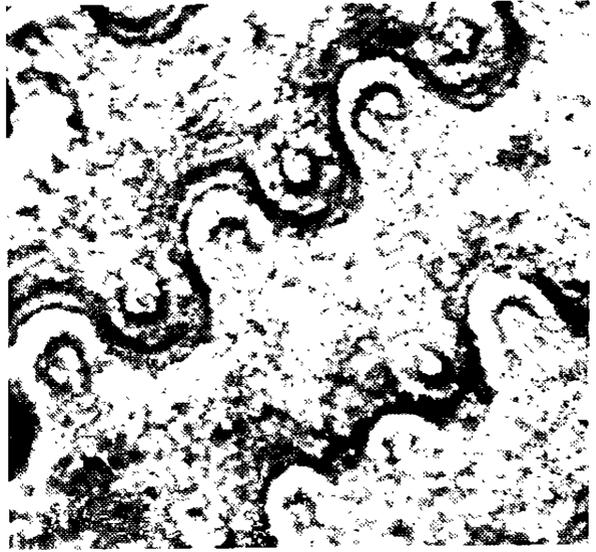
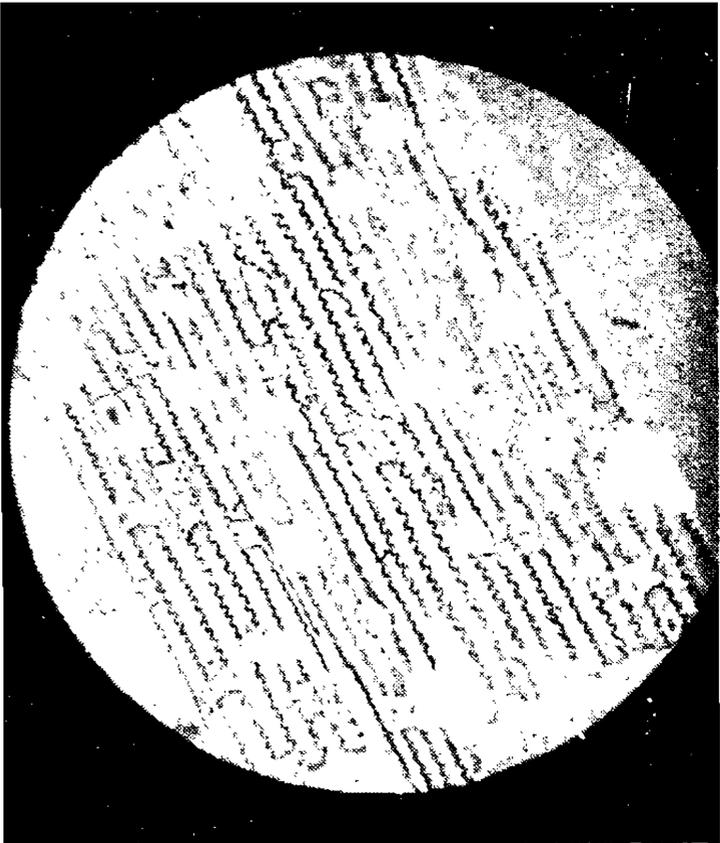
c



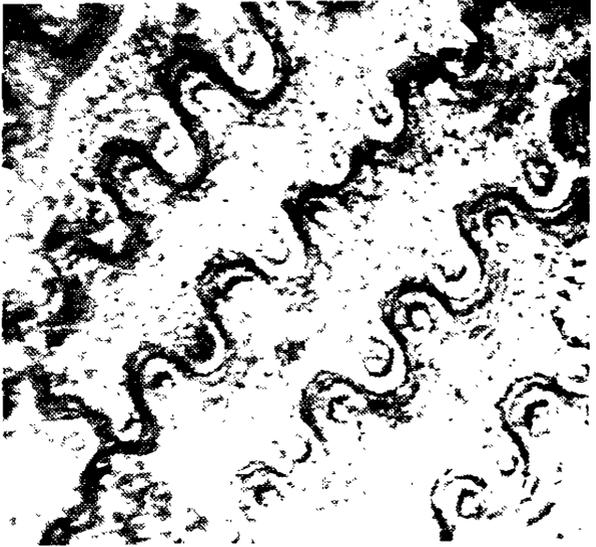
2



1

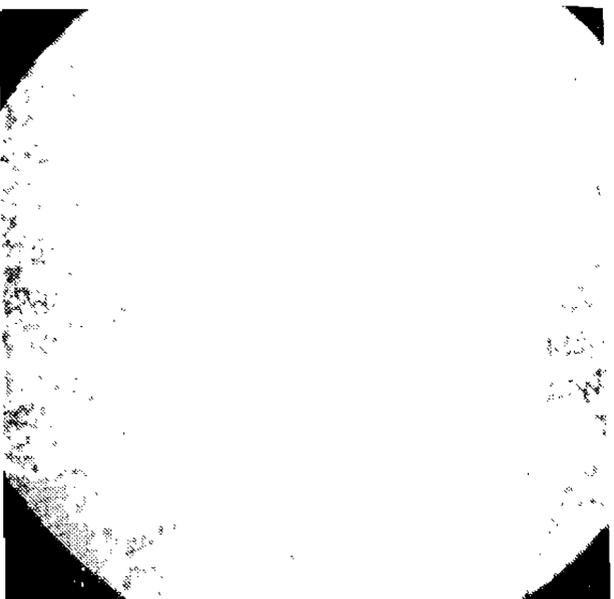


1



1

0



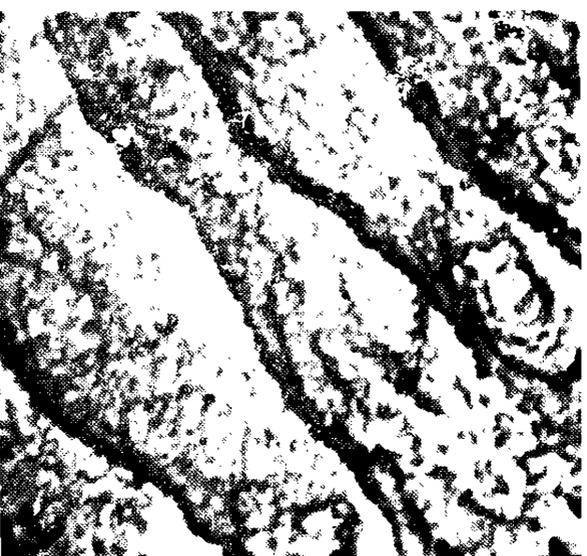
a



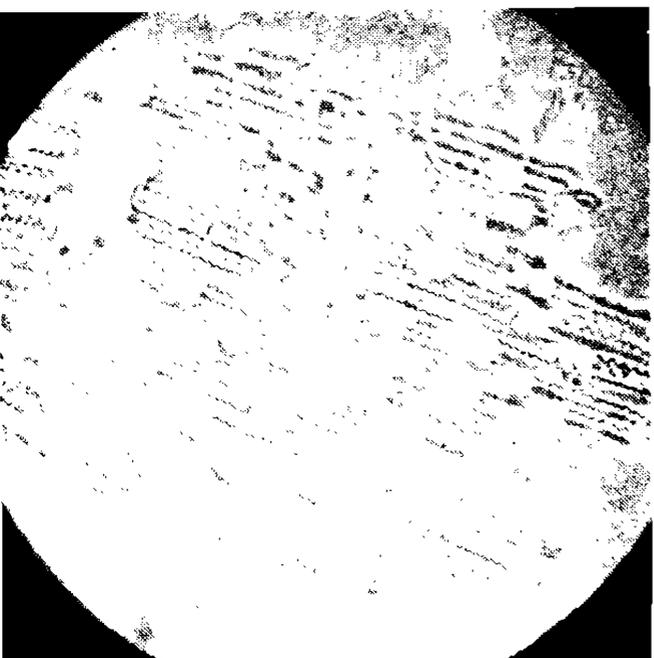
b



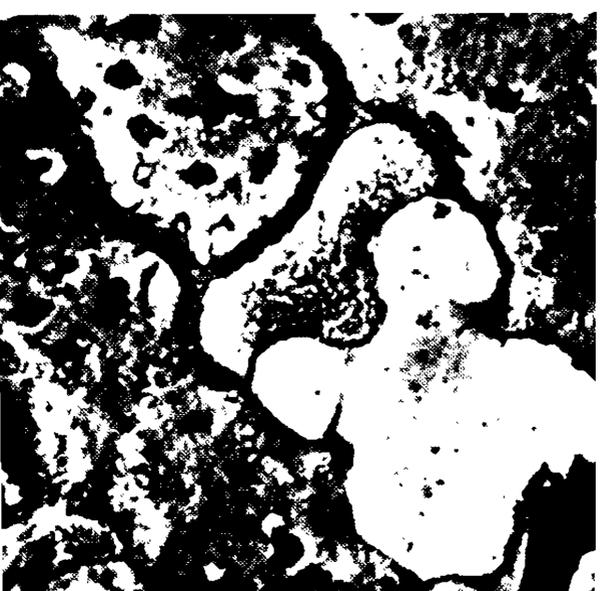
c



d



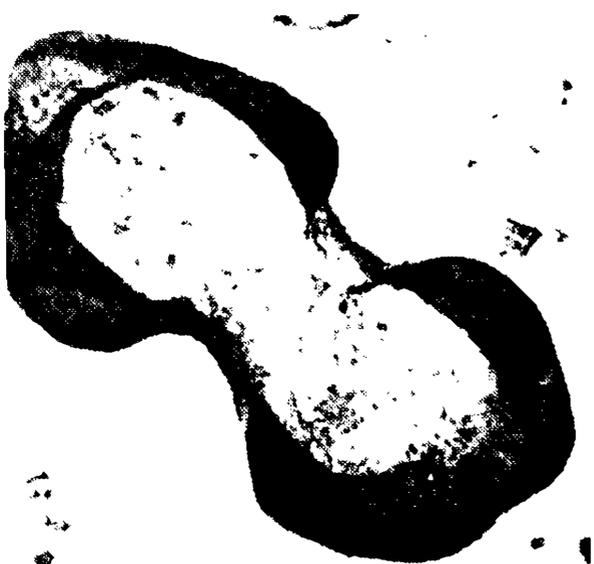
e



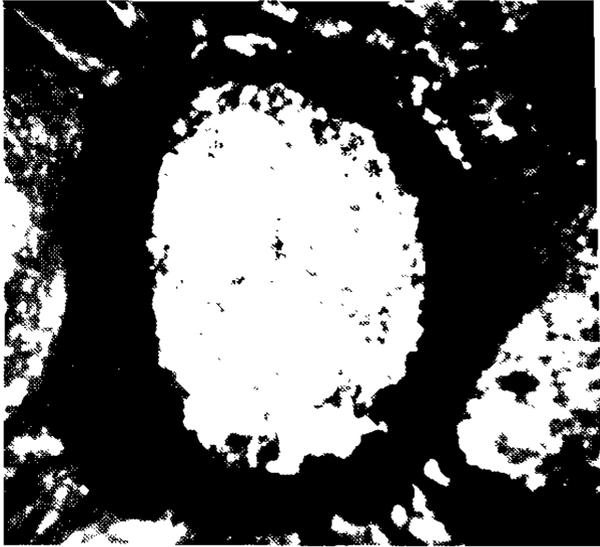
f



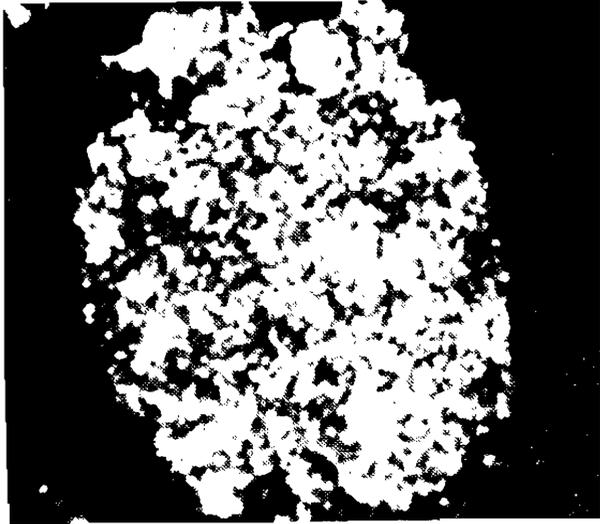
g



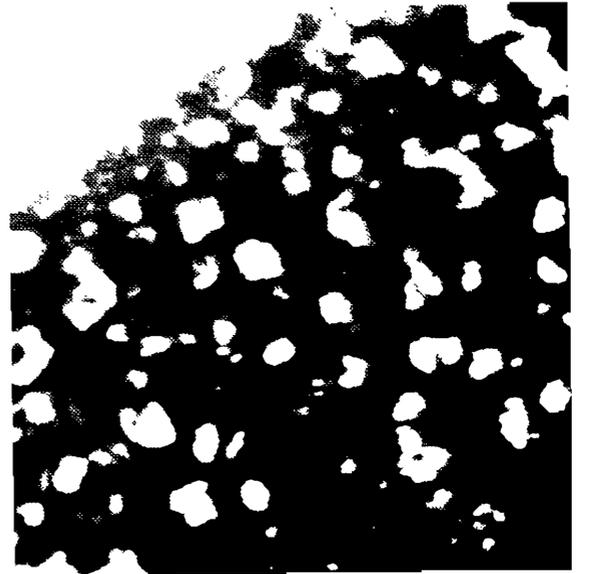
h



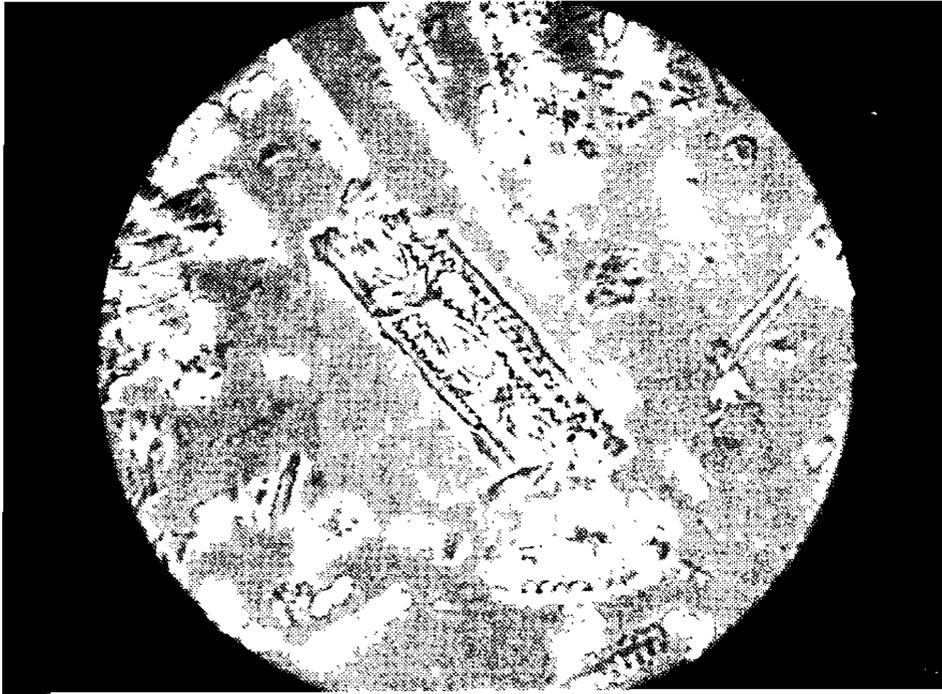
i



j



k



l



m



n



o



p