

CINÉTICA DA ABSORÇÃO DE CÁLCIO NA PRESENÇA DE MAGNÉSIO EM CÉLULAS FOLIARES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L. cv. 'Mundo Novo') *

JOSÉ R. SARRUGE **
 JOSÉ BIASI ***
 PAULO R. C. CASTRO ****
 BRAZ V. DEFELIPO *****
 CELI FEITOSA *****
 FRANCISCO J. KRUG *****
 MAURELIO MORELLI *****

RESUMO

No trabalho apresentado, estudou-se a cinética de absorção de íons, baseado na equação de **LINEWEAVER & BURK (1934)**. O estudo visou verificar o efeito competitivo ou não do íon Mg^{2+} na absorção do íon Ca^{2+} . Para facilidade do estudo, soluções de $CaCl_2$ marcadas com ^{45}Ca foram administradas em diferentes concentrações à tecidos foliares de café (*Coffea arabica* L., cv. 'Mundo Novo'), em solução contendo ou não uma concentração conhecida de $MgCl_2$ segundo a técnica de **SMITH & EPSTEIN (1964a e 1964b)**. São apresentados também cálculos estatísticos, considerados inéditos na aplicação do presente estudo.

Conclue-se que há inibição competitiva devida ao íon Mg^{2+} pelos centros ativos dos carregadores.

INTRODUÇÃO

A dependência da absorção de íons no metabolismo celular já é bastante conhecida. Imaginava-se até 1930 que a absorção dos nutrientes pela planta era governada somente pelo processo denominado difusão. A difusão livre de íons nas partes vivas da célula requer uma membrana celular permeável e esses íons. Em 1940 **Hoagland** demonstrou que a membrana celular não era

* Entregue para publicação em 28/12/1973.
 ** Departamento de Química, E. S. A. "Luiz de Queiroz" — U. S. P.
 *** Estação Experimental de Rio Caçador, EMBRAPA — bolsista CNPq
 **** Departamento de Botânica, E. S. A. "Luiz de Queiroz" — U. S. P.
 ***** Departamento de Fitotecnia, E. S. A. U. F. Viçosa — bolsista CAPES
 ***** Seção de Fertilidade do Solo, I. A. E. S. P. — bolsista CNPq
 ***** Bolsista CNEN — CENA
 ***** Departamento de Solos, F. A. U. F. Santa Maria.

permeável aos íons porque havia uma acumulação iônica no interior da célula mesmo com uma baixa concentração de solutos da solução externa. Concluiu-se também que a absorção de íons inorgânicos pelos tecidos da planta era um processo metabólico, dependente de energia. Se a energia metabólica está ausente, a absorção iônica não ocorre.

A utilização de radioisótopos tem-se apresentado promissora no estudo da cinética da absorção de nutrientes pelas células vegetais. Sabendo-se que a presença natural do elemento como componente celular não interfere no método, seja o que se encontra metabólicamente absorvido, como o que se acha presente no espaço livre aparente, os resultados obtidos expressam unicamente a quantidade de elementos acumulados no processo estudado.

O mecanismo de transporte ativo envolvendo carregadores é análogo ao processo de catálise regulado por enzimas. O íonio combina com o agente carregador para formar um complexo intermediário lábil que em seguida separa-se novamente, sendo que assim verifica-se o processo de transporte em questão. A interferência de espécies químicas pode alterar a cinética do sistema, por combinação com o agente, nos mesmos centros ativos de recepção iônica ou em centros ativos distintos, verificando-se respectivamente interferência competitiva ou não competitiva.

Referências ao antagonismo entre o cálcio e o magnésio evidenciam implicações do processo na prática agrícola devido a importância desses dois nutrientes na agricultura.

No presente trabalho verificaremos se o Mg^{2+} compete ou não com o Ca^{2+} pelos centros ativos de absorção, utilizando tecido foliar de cafeeiro (*Coffea arabica* L., cv. 'Mundo Novo').

REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com **EPSTEIN (1953)**, na superfície externa da membrana citoplasmática estão presentes compostos produzidos metabólicamente, os carregadores, que se ligam ou formam complexos com os íonios. A membrana mostra-se permeável ao complexo; sendo que ao atingir a superfície interna, o carregador é alterado quimicamente de tal modo que o íonio é liberado. O carregador modificado poderá voltar para a superfície externa da membrana onde será reconstituído, ou ser metabolizado, ocorrendo então uma nova formação de carregador, dando continuidade à acumulação.

O processo mostrou-se análogo ao mecanismo enzimático, o que possibilitou a utilização dos princípios desenvolvidos para o estudo da relação enzima-substrato no fenômeno de absorção metabólica.

EPSTEIN & LEGGETT (1954) estudando o ^{89}Sr , verificaram a ocorrência de dois tipos de absorção. O primeiro caracterizou-se por uma absorção através de troca, na qual a raiz atua como um trocador de cátions. No segundo tipo de absorção verifica-se um transporte ativo, mediante processo metabólico, sendo que os dois tipos diferem quanto à cinética, reversibilidade, especificidade iônica e necessidade energética. Os resultados encontrados

mostraram-se de acordo com a hipótese que envolve a formação do composto intermediário íonio-carregador. Verificou-se que o Ca, Sr e Ba competem por centros ativos idênticos no carregador. O Mg^{2+} pareceu não competir na ocupação desses centros, provavelmente ocupando centros ativos diferentes; sendo este resultado também observado por **COLLANDER (1941)**.

MOORE et alii (1961) observaram que o Mg é rapidamente absorvido por raízes destacadas de cevada. Foi evidenciada a natureza metabólica da absorção deste catiônio; uma parte significativa da absorção de Mg^{2+} foi bloqueada efetivamente por pequenas quantidades de Ca^{2+} . Considerou-se que o cálcio atua pela alteração das propriedades permi-seletivas da região da superfície celular.

EPSTEIN (1961) notou que raízes destacadas de cevada absorveram íons de soluções contendo KCl, RbCl e NaCl ou combinações delas, na presença ou ausência de Ca. Verificou-se que o cálcio possui máxima efetividade na manutenção da integridade dos mecanismos de absorção seletiva, na concentração de $1.10^{-3}N$. Outros cations divalentes, notadamente o Mn, são também ativos, mas o Mg mostra-se não efetivo. O cálcio é essencial a integridade dos mecanismos de seletividade do transporte iônico.

MAAS et alii (1969) estudaram o efeito mutualístico entre o Mn, Ca e Mg, durante a absorção, em ensaios efetuados em estado de equilíbrio dinâmico com raízes destacadas de cevada. Ca parece elevar a taxa de absorção de Mn enquanto o Mg possui um efeito depressivo. A combinação entre o Ca e o Mg possui um efeito mais inibitório à absorção de Mn do que o Mg isoladamente. Esses efeitos de mutualismo são explicados pela hipótese de que a seletividade na absorção iônica resulta de alterações na conformação, induzidas pelo catiônio, na estrutura da molécula do carregador.

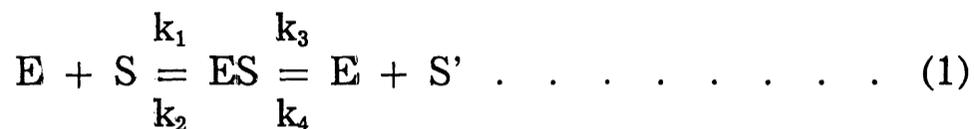
Considera-se que o cálcio encontra-se dentre os catiônios que mais facilmente penetram na membrana devido combinar-se com carregadores presentes na superfície das mesmas (**MITCHELL, 1966**).

EPSTEIN (1966) considera o magnésio um íonio não competitivo na absorção de cálcio por raízes de cevada.

Apesar de se reconhecer que a acumulação iônica contra um gradiente eletroquímico requer energia respiratória, ainda não se determinou exatamente como a respiração e os processos de absorção ativa estão conjugados (**SALISBURY & ROSS, 1969**).

Apesar da natureza dos carregadores ser ainda desconhecida, **LUNDEGARDH (1939)** considera os citocromos implicados no transporte iônico. Na absorção de fosfato, **JACKSON et alii (1962)** demonstraram a participação da fosforilação oxidativa por mitocôndrios. **MITCHELL (1961)** propôs um mecanismo quimiosmótico de transferência em que dois sistemas reversíveis de ATPase podem translocar um ou dois protons respectivamente, por ATP hidrolisado; um sistema reversível de ATPase para a translocação de uma cadeia de oxi-redução para a translocação de protons; sistemas de troca-difusão, unindo a translocação de protons à de ânions e cátions; e a membrana íon-impermeável em que ocorrem os processos descritos.

Dentre os modelos criados para explicar a hipótese do carregador, segundo **FRIED & BROESCHART (1972)**, temos aquele bastante simples de **EPSTEIN & HAGEN, 1952**; modificado por **FRIED & SHAPIRO em 1961**:



E = Carregador contendo um sítio específico de combinação

S = íônio considerado

ES = complexo intermediário

S' = íônio depositado no interior da célula

A equação (1) ou a variação da mesma descreve a acumulação do íon, sendo que a expressão matemática desta equação relaciona a velocidade de absorção e a concentração externa:

$$V = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \dots \dots \dots (2)$$

Tomando-se a recíproca, (**LINEWEAVER & BURK, 1934**), obtém-se a equação da reta, de representação mais ilustrativa:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \dots \dots \dots (3)$$

V = velocidade de formação do complexo ES

V_m = velocidade máxima, isto é, no caso em que a concentração de ES,[ES], for igual à concentração total do carregador presente E.

K_m = constante de **MICHAELIS-MENTEN (MICHAELIS & MENTEN, 1913)**.

[S] = concentração do substrato.

A dedução das equações (2) e (3) pode ser encontrada nas obras de **FRIED & BROEDSHART (1972)** e **BRAY & WHITE (1966)**, sendo que a equação (3) nos fornece subsídios para interpretação do fenômeno de absorção que será apresentado.

Desta forma, uma descrição da equação (3) se faz necessária. Plotando num sistema ortogonal 1/V no eixo das ordenadas e 1/[S] no eixo das abscissas, e sabendo-se que a mesma é a equação de uma reta do tipo y = a + bx, é fácil notar que K_m/V_m é o coeficiente angular daquela reta, e 1/V_m é a interceção desta reta no eixo das ordenadas.

Esta forma de equação é útil desde que nos fornece expressões simples quando há inibição no processo de acumulação.

Quando a velocidade de absorção de um íon pelo tecido da planta é medida na presença de outros íons, três tipos de efeitos tornam-se aparentes.

Assim, o segundo íon, no nosso caso o Mg^{2+} , pode inibir, estimular ou não causar efeito nenhum na velocidade de absorção do dado íon, que consideramos o Ca^{2+} . No primeiro caso nós temos uma inibição competitiva ou não e a taxa de absorção do dado íon é diminuída. No segundo caso, há um estímulo na absorção e a velocidade do íon é aumentada. Finalmente, um terceiro caso seria aquele em que a velocidade do íon não é alterada na presença do segundo.

Os efeitos mútuos entre dois íons dependem dos íons particularmente considerados, de suas concentrações e de diversos fatores, como pH, temperatura, luminosidade e outros (**EPSTEIN, 1962**). De maneira geral, podemos afirmar que os íons quimicamente semelhantes exercem o mesmo tipo de influência.

Deve-se comentar que uma diversidade de idéias acerca da absorção de Ca^{2+} em presença de Mg^{2+} é apresentada em vários trabalhos.

Assim **EPSTEIN (1972)** reafirmou que o Mg^{2+} não interferia na absorção de Ca^{2+} por raízes de cevada em solução. O fato de se considerar raízes pode nos conduzir a uma extrapolação dos dados para tecidos foliares, pois o comportamento é praticamente o mesmo (**SALISBURY & ROSS, 1969**).

Por outro lado, **FRIED & BROESHART (1972)** apresentam como conclusão, através de uma compilação de dados bastante extensa, o fato da acumulação de Ca^{2+} nos tecidos ser inibida quando em presença de Rb^+ , K^+ , Na^+ , Al^+ e Mg^{2+} . Outro fato bastante interessante é o Sr^{2+} também ser inibido por Mg^{2+} . Os mesmos autores citam mais dois trabalhos de importância: **Vose & Fried** apresentam um grande número de comparações sob condições idênticas de laboratório, apresentando o catiônio em diferentes concentrações. Assim, foi também verificado por eles uma inibição na acumulação de Ca^{2+} para concentrações de 10^{-3} e $10^{-5}M$ deste íon quando em presença de Mg^{2+} ; sendo que em 1964, **Johnson & Jackson** trabalhando com trigo, verificaram também inibição na acumulação de Ca^{2+} por Mg^{2+} .

MATERIAIS E MÉTODOS

A técnica seguida foi em linhas gerais o procedimento proposto por **SMITH & EPSTEIN (1964a; 1964b)**, com algumas alterações.

Foram coletados o terceiro e quarto pares de folhas de cafeeiro (**Coffea arabica** L., cv. 'Mundo Novo') a partir da parte terminal de ramos não produtivos, sendo estes situados na altura mediana de diversas plantas. As folhas, após lavadas com água desmineralizada, eram seccionadas em porções de 2 x 3 cm, em ambos os lados da nervura central. Simultaneamente ao preparo das amostras, erlenmeyers contendo 495 ou 490 ml de água desmineralizada, com arejamento, eram colocados em banho-maria com agitação da água, à temperatura constante de 30°C e intensidade luminosa de 2.400 lux.

As secções de folhas em número de 35, foram superpostas e prensadas entre suportes apropriados de batata para serem levadas ao micrótomo, onde eram efetuados três cortes longitudinais, obtendo-se 105 lâminas de tecidos

de 300 μm cada, de maneira a proporcionar cerca de 50 mg de matéria seca. Este tecido foliar era imediatamente colocado nos erlenmeyers, ficando imerso na água onde permanecia por 15 minutos para a estabilização.

Previamente foram preparadas soluções contendo cálcio radioativo (^{45}Ca), nas seguintes concentrações:

$5 \times 10^{-4}\text{M}$	CaCl_2 para os tratamentos 1 e 6
$2 \times 10^{-3}\text{M}$	CaCl_2 para os tratamentos 2 e 7
$8 \times 10^{-3}\text{M}$	CaCl_2 para os tratamentos 3 e 8
$3,2 \times 10^{-2}\text{M}$	CaCl_2 para os tratamentos 4 e 9
$1,28 \times 10^{-1}\text{M}$	CaCl_2 para os tratamentos 5 e 10
e 10^{-1}M	MgCl_2 para os tratamentos de 6 a 10

Por ocasião do tratamento das amostras, foram adicionados 5 ml da solução estoque anterior, aos erlenmeyers contendo os cortes, proporcionando uma diluição de 1:100.

A atividade de ^{45}Ca variou de 0,1 a 4,0 μCi no volume final. Para os tratamentos que recebiam Mg, eram adicionados também anteriormente à adição de cálcio, 5 ml da solução de MgCl_2 . Manteve-se o pH em $5,5 \pm 0,2$.

O tecido permanecia por 30 minutos imerso em solução contendo ^{45}Ca ou $^{45}\text{Ca} + \text{Mg}$. E para que houvesse possibilidade de controlar o tempo com precisão, fez-se um cronograma em que cada tratamento era iniciado com diferença de 2 minutos do seguinte.

Após 29 minutos de imersão, os erlenmeyers eram retirados do banho-maria, a solução succionada, e aos 30 minutos o tecido era lavado e imerso em solução de CaCl_2 10^{-3}M , cuja temperatura era de $5-10^\circ\text{C}$ por 20 minutos para paralisar o processo metabólico e provocar a dessorção do ^{45}Ca . Um minuto antes do final da dessorção, o material era passado para peneira, iniciando-se a lavagem com água corrente até completar os 20 minutos.

Lavado, o material era colocado em estufa a 70°C , em cadinhos, onde permanecia até peso constante. Uma vez seco e pesado, o material era incinerado em mufla elevando-se a temperatura gradualmente até 600°C , sob a qual permanecia até a completa incineração.

O material incinerado após resfriado, recebia à temperatura ambiente 1 ml da solução de HCl 0,2 N, agitando-se levemente para a completa dissolução da cinza, e com pipeta eram retirados 0,8 ml da dissolução e depositados em pranchetas Nuclear Chicago, sob luz infra-vermelha para secagem mais rápida do material. Para evitar a higroscopicidade do CaCl_2 , adicionou-se gotas de H_2SO_4 0,5N obtendo-se assim CaSO_4 após a secagem. Obtidas as pranchetas, eram efetuadas as contagens em contador Geiger-Muller com janela fina e obtidas as atividades específicas das amostras, através de comparação com padrões previamente preparados.

Os resultados são apresentados na forma da relação de **LINEWEAVER-BURK**, onde retas são calculadas relacionando os pontos $1/V$ versus $1/[S]$.

Os dez tratamentos foram executados com 4 repetições.

Efetou-se o estudo estatístico dos resultados através da análise de variância e equações de regressão para absorção de Ca^{2+} na presença e ausência de Mg^{2+} .

A fim de ser verificado se os parâmetros das equações de regressão eram de valores diferentes, aplicou-se o teste t para nulidade, até uma significância a 20%.

Calculou-se a velocidade máxima (V_m) e as constantes **MICHAELIS-MENTEN** (K_m) e aplicou-se também o teste de **TUKEY** para comparação de médias, a fim de ser verificado se algum tratamento alcançou a velocidade máxima de absorção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resumindo os resultados obtidos em cada tratamento organizou-se o quadro 1.

Quadro 1 — Absorção de cálcio durante 30 minutos em íons microgramas de Ca^{2+} /g de matéria seca (V).

Tratamentos		Conc. CaCl_2M	Repetições			
Sem Mg^{2+}	1	5.10^{-6}	3,442	3,195	3,384	2,905
	2	2.10^{-5}	7,442	5,700	8,008	6,345
	3	8.10^{-5}	11,963	14,504	23,849	18,964
	4	$3,2.10^{-4}$	10,553	25,020	28,056	19,305
	5	$1,28.10^{-3}$	35,852	26,985	32,551	25,786
Com MgCl_2 10^{-3}M	6	5.10^{-6}	0,645	0,574	0,442	0,527
	7	2.10^{-5}	1,869	1,072	2,160	2,007
	8	8.10^{-5}	4,886	4,301	7,318	6,131
	9	$3,2.10^{-4}$	9,459	10,645	15,651	14,429
	10	$1,28.10^{-3}$	20,648	20,356	24,226	25,494

Para fins de cálculo, tabulou-se os dados em função do inverso das concentrações e em função dos inversos dos teores absorvidos de cálcio. Foi desenvolvido o tratamento matemático separadamente para os tratamentos na ausência e presença do magnésio.

O quadro 2 apresenta os dados de absorção de cálcio na ausência de magnésio.

Quadro 2 – Absorção de cálcio na ausência e presença de magnésio representando o inverso da velocidade [$1/V$ (íons $\mu\text{g Ca}^{2+}/30 \text{ min/g}$ de matéria seca)] e o inverso da concentração do cálcio na solução.

Tratamentos	1		1/V			
		CaCl ₂ M	I	II	III	IV
Sem Mg ²⁺	1	200.000	0,291	0,313	0,295	0,344
	2	50.000	0,134	0,175	0,125	0,158
	3	12.500	0,084	0,068	0,042	0,053
	4	3.125	0,095	0,040	0,035	0,052
	5	781	0,028	0,037	0,031	0,039
Com Mg ²⁺	6	200.000	1,550	1,742	2,262	1,898
	7	50.000	0,535	0,933	0,463	0,498
	8	12.500	0,205	0,232	0,137	0,163
	9	3.125	0,106	0,094	0,064	0,069
	10	781	0,049	0,049	0,041	0,039

As análises das variâncias mostraram o seguinte resultado:

Causas de variação	G.L.	Ca ²⁺		Ca ²⁺ + Mg ²⁺	
		Q.M.	F	Q.M.	F
Tratamento	(4)	0,052126	118,20**	2,3342	82,48**
Linear	1	0,203219	460,81**	9,2984	328,57**
Resto	3	0,001760	3,99	0,0128	0,45
Erro	15	0,000441	—	0,0283	—
Total	19	—	—	—	—
C.V.%		17,29		30,23	

As equações de regressão linear segundo **LINEWEAVER & BURK, (1934)** foram calculadas e mostraram:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ na ausência } \text{Mg}^{2+} : Y = 0,050684 + 0,00000134 \times \quad (4)$$

$$\text{Ca}^{2+} \text{ na presença } \text{Mg}^{2+} : Y = 0,074881 + 0,00000904 \times \quad (5)$$

Y = inverso da velocidade de penetração.

X = inverso da concentração de cálcio na solução.

Com o objetivo de traçar as curvas de regressão, necessitávamos verificar se os parâmetros a e b das equações (4) e (5) ($Y = a + bX$) eram diferentes. Para isso usamos o teste t para nulidade com $n_1 + n_2$ graus de liberdade, sendo n os graus de liberdade do erro.

Para estes usamos as fórmulas:

1) s_p^2 = estimativa da variância média.

$$s_p^2 = \frac{\text{s. q. erro}_1 + \text{s. q. erro}_2}{\text{G.L. erro}_1 + \text{G.L. erro}_2}$$

2) t_b = valor de t para testar o parâmetro b

$$t_b = \frac{b_2 - b_1}{\sqrt{s_p^2 \left(\frac{1}{\Sigma x_1^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{N}} + \frac{1}{\Sigma x_2^2 - \frac{(\Sigma x_2)^2}{N}} \right)}} = \frac{b_2 - b_1}{\sqrt{s_p^2 \left(\frac{2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}} \right)}}$$

(pois $x_1 = x_2$)

3) t_a = valor de t para testar o parâmetro a

$$t_a = \frac{a_2 - a_1}{\sqrt{s_p^2 \left[\frac{2}{N} + \left(\frac{\bar{x}_1^2}{\Sigma x_1^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{N}} + \frac{\bar{x}_2^2}{\Sigma x_2^2 - \frac{(\Sigma x_2)^2}{N}} \right) \right]}} = \frac{a_2 - a_1}{\sqrt{s_p^2 \left(\frac{2}{N} + \frac{2\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}} \right)}}$$

4) Valores da análise dos tratamentos na ausência de magnésio

$$Y = 0,050684 + 0,00000134 \times$$

$$s. q. erro_1 = 0,006615$$

$$g. l. erro_1 = 15$$

5) Valores da análise dos tratamentos na presença de magnésio

$$Y = 0,074881 + 0,00000904 \times$$

$$s. q. erro_2 = 0,423797$$

$$g. l. erro_2 = 15$$

6) Cálculos:

$$s_p^2 = 0,14347$$

$$t_b = \frac{0,000007701}{0,000000856} = 8,992^{**} \quad (t_{\text{tabulado } 1\%} = 2,75).$$

$$t_a = \frac{0,024197}{0,059280} = 0,408 \text{ n. s. } (t_{\text{tabulado } 20\%} = 1,31).$$

Rejeitamos o teste para comparação de **b** e aceitamos para os valores de **a**. Resta-nos determinar qual será o valor **a** médio (a_p) que servirá à ambas as equações. Uma vez que a diferença entre os valores de a_1 e a_2 é proporcional à soma dos desvios padrões de ambas as equações, a diferença entre a_p (valor médio de **a**) e os valores de a_1 ou a_2 é proporcional ao desvio padrão de a_1 ou a_2 respectivamente.

A determinação do valor médio de **a** (a_p) obedeceu aos seguintes cálculos:

$a_1 = 0,050684$	$s_1 = 0,02100$
$a_2 = 0,074881$	$s_2 = 0,16822$

$$\Delta (a_2 - a_1) = 0,024197 \quad \text{soma} = 0,18922$$

$$0,024197 \text{ ————— } 0,18931$$

$$(a_p - a_1) \text{ ————— } 0,02100$$

$$a_p - a_1 = 0,002684$$

$$a_p = 0,050684 + 0,002684 = 0,053368$$

Verificou-se que as ordenadas de origem das equações (4) e (5) não se diferenciaram significativamente. efetuou-se um ajustamento ao mesmo valor

de a , resultando uma ordenada de origem comum às duas retas. Desta forma, obtiveram-se as equações abaixo:

$$Y_1 = 0,053368 + 0,00000134 \times$$

$$\text{ou } \frac{1}{V_2} = 0,53368 + 0,00000134 \cdot \frac{1}{Ca^{2+}} \quad (6)$$

$$Y_2 = 0,53368 + 0,00000904 \times$$

$$\text{ou } \frac{1}{V_1} = 0,053368 + 0,00000904 \cdot \frac{1}{Ca^{2+}} \quad (7)$$

onde (6) e (7) representam a equação de **LINEWEAVER & BURK (1934)**, considerando-se a absorção de Ca^{2+} em ausência e presença de Mg^{2+} , respectivamente. Tais equações mostraram-se significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F como mostra o quadro 2. É fácil notar que os coeficientes angulares destas duas retas são bastante distintos, mostrando que a absorção de Ca^{2+} nos dois casos é altamente diferenciada. Verificou-se que estes valores diferenciaram significativamente ao nível de 1% pelo teste t de nulidade.

Considerando as equações 6 e 7, calculou-se as constantes de **MICHAELIS-MENTEN** e a velocidade de absorção máxima para o cálcio em solução pura e na presença de magnésio.

A velocidade de absorção máxima é a mesma em ambos os casos, sendo:

$$V_m = \frac{1}{a} = \frac{1}{0,053368} = 18,738 \text{ íons } \mu\text{g } Ca^{2+}/30 \text{ min/g m. s.}$$

A constante de **MICHAELIS-MENTEN** para o cálcio em solução pura foi:

$$K_{m_1} = b_1 \cdot V_m = 0,00000134 \times 18,738$$

$$K_{m_1} = 2,51 \cdot 10^{-5} M \text{ CaCl}_2$$

A constante de **MICHAELIS-MENTEN** para o cálcio em presença do ion magnésio foi:

$$K_{m_2} = b_2 \cdot V_m = 0,00000904 \times 18,738$$

$$K_{m_2} = 1,69 \cdot 10^{-4} M \text{ CaCl}_2$$

Fazendo K_{m_2}/K_{m_1} notamos que a afinidade do carregador para cálcio diminui de 6,7333 vezes quando em presença do ion magnésio, pois:

$$\frac{1,69 \cdot 10^{-4}}{2,51 \cdot 10^{-5}} = 6,733$$

Conhecendo-se o inverso da velocidade máxima de absorção, que é o valor de a (0,053368), restou-nos verificar se algum dos tratamentos e qual deles apresentou este valor. Para isto realizamos o teste de **TUKEY** a 1% para comparação de médias, nos inversos das absorções ($\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$).

Para o experimento 1, na absorção de cálcio em solução pura, encontramos:

$q = 5,5$ a 1% probabilidade

$$\Delta = 5,5 \frac{0,02100}{\sqrt{4}} = 0,05776$$

Tratamentos	Médias (*)	Diferenças (TUKEY 1%)
1	0,3108	
2	0,1480	
3	0,0617	
4	0,0556	
5	0,0336	
Coef. a	0,0534	X X

(*) $\frac{1}{\text{íon } \mu\text{g Ca}^{2+}/30 \text{ min/g m.s.}}$

Para o experimento 2 na absorção de cálcio em presença de magnésio, o resultado apresentou:

$q = 5,5$ a 1% probabilidade

$$\Delta = 5,5 \cdot \frac{0,16822}{\sqrt{4}} = 0,4626$$

Tratamentos	Médias (*)	Diferenças (TUKEY 1%)
6	1,8622	
7	0,6072	X
8	0,1842	X
9	0,0842	
10	0,0446	
Coef. a	0,0534	X

(*) $\frac{1}{\text{íons } \mu\text{g Ca}^{2+}/30 \text{ min / g m.s.}}$

Verificou-se que, no 1.º caso, ou seja, considerando-se o Ca^{2+} em solução pura, nos tratamentos (3, 4 e 5) cujas concentrações foram de 8×10^{-5} , $3,2 \times 10^{-4}$ e $1,28 \times 10^{-3}$ molar de Ca, a velocidade máxima de absorção já hou-
vera sido alcançada uma vez que não diferiram significativamente do valor $1/V_m = 0,053368$ íons $\mu\text{g Ca}^{2+}/30 \text{ min/g}$ matéria seca. Idêntico resultado foi obtido para as mesmas concentrações do 2.º caso (8, 9 e 10), ou seja, quando consideramos as soluções de Ca^{2+} em presença de uma solução de 10^{-3}M de Mg^{2+} .

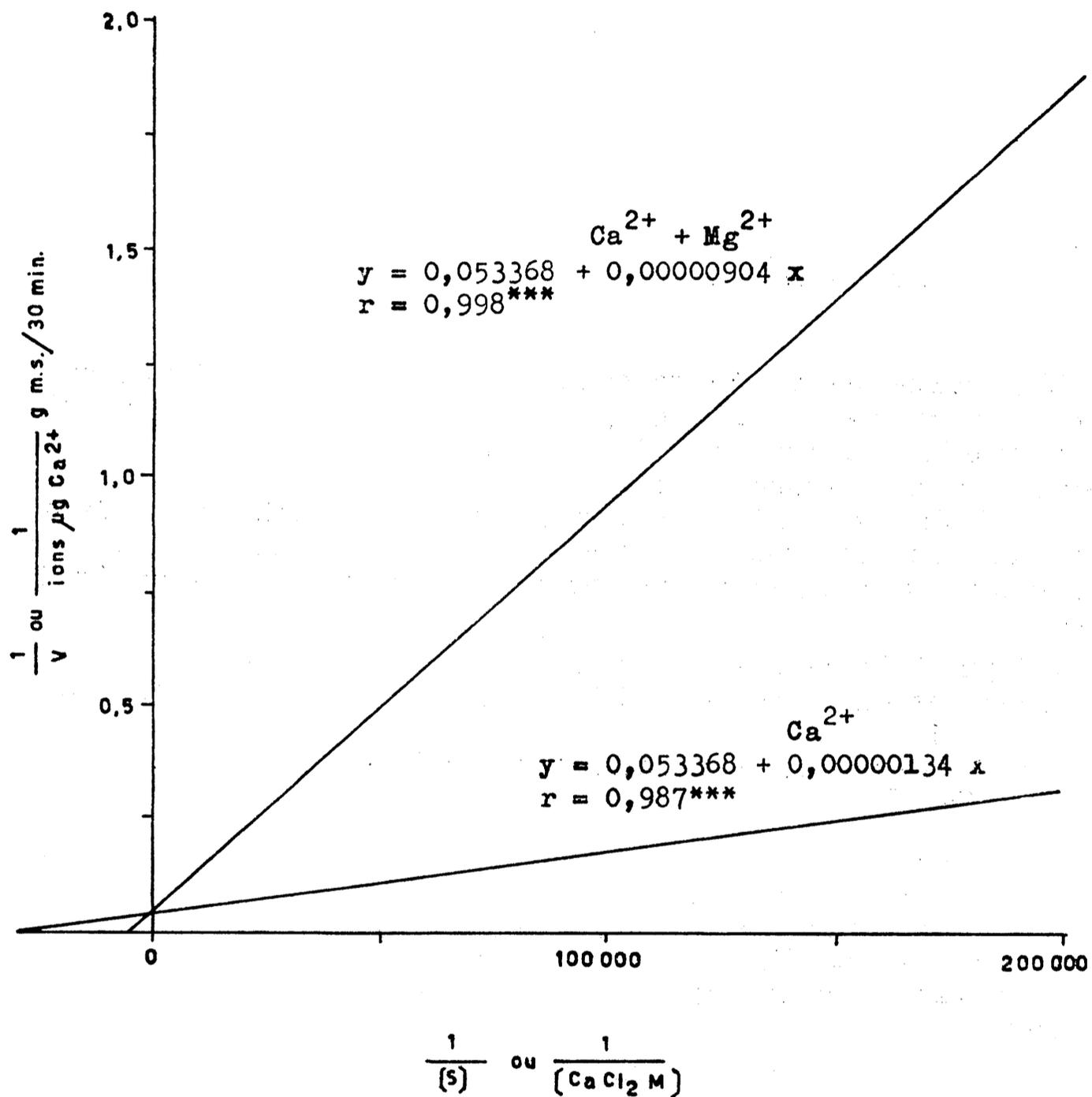
A figura 1 ilustra as equações (6) e (7), onde $1/V$ é relacionado no eixo das ordenadas em $1/\text{íons } \mu\text{g de Ca}^{2+}/30 \text{ min por grama de matéria seca}$, e $1/[S]$ ou $\frac{1}{[\text{Ca}^{2+}]}$ no eixo das abcissas em molaridade.

Pelos dados já apresentados, segundo a equação de **LINEWEAVER & BURK (1934)** observamos que as ordenadas de origem das equações (4) e (5) não apresentaram diferença significativa, ao passo que o coeficiente angular mostrou-se significativamente diferente evidenciando, desta forma, o efeito comparativo do íon Mg^{2+} ao íon Ca^{2+} pelos centros ativos dos carregadores .

Isto vem confirmar os trabalhos de revisão de **FRIED & ROESHART (1972)** no qual os trabalhos de **Johnson & Jackson** e **Vose & Fried** mostram-se em evidência.

Entretanto, **CRUZ (1973)**, igualmente trabalhando com cortes foliares de cafeeiro, concluiu por uma inibição não competitiva entre o magnésio e cálcio.

Figura 1 - Retas representativas da absorção de cálcio em ausência e presença de magnésio, segundo a equação de LINEWEAVER & BURK (1934), com valores ajustados.



Nota-se que o desvio médio significativo das ordenadas de origem das equações lineares obtidas por ele alcançaram diferença significativa pelo teste *t* a 20%, bem como a concentração de Mg Cl₂ foi 5 vezes maior e o tempo de absorção foi de 1 hora, sendo o dobro por nós utilizado, explicando em parte as diferenças de resultados.

CONCLUSÕES

Baseados nos resultados apresentados, concluímos:

- a) Foi alcançada a velocidade máxima na absorção do cálcio .
- b) O valor desta velocidade máxima não foi diferente para o cálcio em ausência ou presença do magnésio.
- c) Este valor é igual a 18,738 íons $\mu\text{Ca}^{2+}/30$ min/g matéria seca.
- d) O magnésio competiu com o cálcio pelos mesmos centros ativos do carregador, provocando inibição competitiva.

SUMMARY

KINETIC OF CALCIUM ABSORPTION IN PRESENCE OF MAGNESIUM IN EXCISED LEAF TISSUE OF COFFEE-TREE (*Coffea arabica* L., cv 'MUNDO NOVO').

This study based on **LINEWEAVER & BURK's (1934)** equation was made to verify both competitive or not effect of Mg²⁺ in absorption of Ca²⁺ ion. Solution of CaCl₂ was traced with ⁴⁵Ca. Calcium in different concentration was added to excised leaf tissue of Coffee-tree (*Coffea arabica* L.) in presence or not of magnesium, according to **SMITH & EPSTEIN's (1964a.; 1964b.)** technique. Special conduction in statistics was applied .

Magnesium ion compete with calcium ion to active centers of metabolism transport.

LITERATURA CITADA

- BRAY, H. G. & WHITE, K., 1966 — Kinetics and thermodynamics in biochemistry. 2.^a edição. J. A. CHURCHILL Ltd., London. 418 pp.
- BOWEN, H. J. M., 1966 — Trace elements in Biochemistry. Academic Press. Inc., London. 241 pp.
- COLLANDER, R., 1944 — Selective adsorption of cation by higher plants. *Plant Physiol.* 16: 691-720.
- CRUZ, A. D., 1973 — Absorção de cálcio pelos tecidos da folha do cafeeiro (*Coffea arabica* L., var. Mundo Novo). Tese para obtenção do título de doutor, ESALQ — Piracicaba. 43 pp.
- EPSTEIN, E., 1953 — Mechanism of ion absorption by roots. *Nature.* 171: 83-84.
- EPSTEIN, E., 1956 — Mineral nutrition of plants: Mechanisms of uptake and transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7: 1-24.

- EPSTEIN, E., 1961 — The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells *Plant. Physiol.* 31: 437-444.
- EPSTEIN, E., 1962 — Mutual effects of ions in their absorption by plants. *Agrochimica.* 6: 293-322.
- EPSTEIN, E., 1972 — Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley & Sons. New York.
- EPSTEIN, E. & HAGEN, C. E., 1952 — A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* 27: 457-474.
- EPSTEIN, S. & LEGGETT, I. E. 1954 — The absorption of alkaline earth cations by barley roots: Kinetics and mechanism. *Amer. J. Bot.* 41 (10): 785-791
- FRIED, M. & BROESCHART, H., 1972 — The soil-plant system in relation to inorganic nutrition. Academic Press, London. 358 pp.
- FRIED, M. & SHAPIRO, R. E., 1961 — Soil-plant relationships in ion uptake. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12: 91-112.
- HOAGLAND, D. R., 1944 — Lectures of the inorganic nutrition of plants. In *Inorganic Plant Nutrition*. Published by Chronica Botanica Comp., Waltham, Massachusetts. 226 pp.
- JACKSON, P. C., HENDRICKS, S. B. & VASTA, B. M., 1962 — Phosphorylation by barley roots mitochondria and phosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.* 37: 8-17
- LINEWEAVER, H. & BURK, D., 1934 — The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- LUNDEGARDH, H., 1939 — An electro-chemical theory of salt absorption and respiration. *Nature.* 143: 203-206.
- MAAS, E. V., MOORE, D. P. & MASON, B. J., 1969 — Influence of calcium and magnesium on manganese absorption. *Plant Physiol.* 44: 796-800.
- MICHAELIS, L. & MENTEN, M. L., 1913 — Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49: 333-369.
- MITCHELL, P., 1961 — Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 191: 144-148.
- MITCHELL, P., 1966 — Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 41: 445-502.
- MOORE, D. P., JACOBSON, L. & OVERSTREET, R., 1961 — Uptake of calcium by excised barley roots. *Plant Physiol.* 36: 53-57.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C., 1969 — Plant physiology. Wadsworth Publishing Comp. Belmont, California. 747 pp.
- SMITH, R. C. & EPSTEIN, E., 1964a — Ion absorption by shoot tissue: Technique and first findings with excised leaf tissue of corn. *Plant Physiol.* 39: (3): 338-341.
- SMITH, R. C. & EPSTEIN, E., 1964b — Ion absorption by shoot tissue: Kinetics of potassium and rubidium absorption by corn leaf tissue. *Plant Physiol.* 39 (6): 992-996.