

UMA ANÁLISE TERMOBIOLOGICA DA GERMINAÇÃO

Victor José Mendes Cardoso¹

¹ Instituto de Biociências, UNESP, Univ Estadual Paulista - Campus de Rio Claro, Departamento de Botânica, C.P. 199, Rio Claro, SP, Brasil

RESUMO

A partir da análise da cinética do processo, pode-se assumir o processo global de germinação como endergônico, não ocorrendo a menos que certo limiar energético, representado pela entalpia de ativação (ΔH^*), seja alcançado. No caso da germinação, a ΔH^* deve variar com a temperatura, sendo que a análise de sua distribuição ao longo de todo o intervalo térmico sugere que em temperaturas extremas $|\Delta H^*|$ é alta, sendo que o processo cessaria devido a uma demanda de energia acima da capacidade de suprimento energético pelas reações metabólicas exergônicas. Em temperaturas infra-ótimas a variação de ΔH^* é positiva, significando que a velocidade de germinação é limitada por processos parciais voltados ao crescimento do embrião, enquanto que na faixa supra-ótima ΔH^* é negativo, indicando a predominância de processos antagônicos à germinação. Em temperaturas ótimas, a velocidade deve ser limitada principalmente por processos de difusão, como a embebição. Processos de termodenaturação, indicados por valores elevados de ΔH^* , devem afetar a percepção e a capacidade de transdução do sinal térmico na semente. Com a dependência-T da velocidade germinação, a distribuição das frequências de germinação isotérmica pode variar com a temperatura, sendo que a análise dessas distribuições sugere hipóteses sobre como o sinal térmico é percebido pela semente.

Palavras chave: energia de ativação; entalpia; entropia; sementes; comunicação térmica; sincronização

ABSTRACT

From the kinetics analysis of the process, one can assume the overall seed germination process as endergonic, and it does not occur unless certain energy threshold, represented by the enthalpy activation (ΔH^*) is reached. For germination, ΔH^* vary with temperature, and the analysis of its distribution over the entire temperature range suggests that at extreme temperatures $|\Delta H^*|$ is high and the process would cease due to an increasing requirement of energy eventually beyond the capacity of supply by the metabolic exergonic reactions. At temperatures below optimum the enthalpy change is positive, which implies that the germination rate is limited by the temperature dependence of processes synergistic to the embryo growth, whereas in the supra-optimum temperature range ΔH^* is negative, indicating the predominance of antagonistic partial steps. At optimum temperatures, the germination rate should be primarily limited by diffusion processes, such as imbibition. Thermal denaturation processes, denounced by their high $|\Delta H^*|$ values, should affect both the perception and transduction of the temperature signal within the seed. Considering the temperature dependence of the germination rate, the frequency distribution of isothermal germination may vary with temperature, and the analysis of those distributions suggests hypotheses about how the thermal signal is perceived by the seed.

Key words: activation energy; enthalpy; entropy; seeds; thermal communication; synchronization

INTRODUÇÃO

A semente corresponde a uma fase do desenvolvimento da planta que começa com a fecundação e termina com o dessecamento ou desidratação, sendo constituída de um efetuator do crescimento (o embrião), uma fonte de energia potencial (material "de reserva") e uma interface (os tegumentos).

A germinação é um dos estádios mais críticos na vida da planta e, portanto, na sobrevivência da espécie, podendo ser definida como o conjunto de etapas e processos relacionados à retomada das atividades metabólicas e do crescimento do embrião em sementes maduras de espermatófitas em condições favoráveis de água, atmosfera e temperatura, com o conseqüente rompimento do tegumento (Labouriau 1983; Cardoso 2008). A germinação da semente como processo global envolve, por sua vez, a interação de diferentes processos parciais relativos aos diferentes compartimentos da semente (Labouriau 1972b). Segundo Labouriau (1970), os trabalhos de germinação podem ser conduzidos do ponto de vista da população de sementes ou sob o prisma dos processos fisiológicos envolvidos. Quando encarada como um processo cinético, ou seja, que se realiza com certa velocidade, a germinação pode ser caracterizada pela velocidade específica de crescimento, considerada como o inverso dos tempos de germinação ($1/t$) (Labouriau 1972b), e pela distribuição dos tempos de germinação de sementes individuais dentro de uma população. Essa modalidade de análise pode assim levar à partição de uma população de sementes em sub-populações fisiologicamente mais homogêneas, ou ao fracionamento do processo global de germinação de sementes em um conjunto de processos fisiológicos mais simples (Labouriau 1970). A germinabilidade (porcentagem final de sementes germinadas) varia com a temperatura de incubação, sendo essa dependência descrita pelos parâmetros: a) temperatura cardeal mínima (T_m); b) temperatura cardeal máxima (T_M) e; c) temperatura ou intervalo térmico onde a germinação é máxima e uniforme (T_o). A existência dessas temperaturas cardiais leva à questão do por que sementes podem germinar apenas dentro de um determinado intervalo térmico e, dentro desse intervalo, por que a distribuição dos tempos de germinação de sementes individuais varia tanto em função da temperatura. Nesse sentido, a velocidade de germinação – representada pela velocidade média – é geralmente muito mais termo-dependente do que a germinabilidade, sendo que o principal interesse no estudo da dependência térmica da velocidade de germinação reside na busca por fatores limitantes e processos parciais da germinação de sementes (Labouriau 1983). O principal objetivo desta pequena revisão é apresentar uma síntese da abordagem termodinâmica da germinação de sementes, com base principalmente nas teorias apresentados pelo Prof. Luiz F. G. Labouriau em sua análise do processo de germinação como um problema termobiológico.

GERMINAÇÃO, ENERGIA E ENTALPIA DE ATIVAÇÃO

A germinação é um processo que consome energia, sendo, portanto, endergônico. O caráter endergônico (consumidor de energia) do desenvolvimento do

embrião implica na existência de um processo parcial exergônico (fornecedor de energia) e de um acoplamento energético entre ambos. Esse acoplamento permite que o sistema ultrapasse uma barreira de energia potencial (E_a = energia livre de ativação) e o processo global de germinação seja desencadeado. O processo todo pode ser considerado à luz do modelo representado por uma reação química: $S \rightarrow^k P$, onde S representa os reagentes, P os produtos e k é uma constante de velocidade, para a qual Arrhenius desenvolveu uma teoria qualitativa e simples que tem contribuído para o conhecimento das velocidades de reações químicas (Oliveberg et al. 1995). Na Figura 1, S representa uma substância em seu estado energético "normal" ou zero na escala de energia. De acordo com o conceito de Arrhenius, existe também um estado transitório de maior energia, chamado de "estado ativado", a partir do qual são formados os produtos (P). Portanto, a reação $S \rightarrow P$ passa necessariamente pelo estado ativado, mesmo sendo uma reação termodinamicamente viável, onde a energia livre dos produtos é menor do que a dos reagentes (reação exotérmica). Essa reação depende, assim, do número de moléculas de S em estado ativado. Assumindo a função de distribuição de Boltzmann, e considerando-se que os reagentes estão num nível "zero" de energia, a fração de moléculas de reagente no estado ativado corresponde a $[(e^{-E_a/RT})/(1+e^{-E_a/RT})]$, onde T é a temperatura absoluta, R a constante dos gases e E_a a energia de ativação $[(J.(kg.mol)^{-1})]$, que é a diferença de energia livre entre o estado "zero" e o ativado. Com base nesse modelo, a constante de velocidade (k) pode ser representada pela equação: $k = Ae^{-E_a/RT}$, onde A é uma constante. Essa equação, denominada equação de Arrhenius, pode ser linearizada por transformação logarítmica, produzindo $\ln k = \ln [A - (E_a/RT)]$ (Johnson e Thornley 1985). O chamado "gráfico de Arrhenius" representa portanto a relação entre o logaritmo da velocidade da reação ($-R \cdot \ln k$) e a recíproca da temperatura ($1/T$), sendo a energia de ativação igual à inclinação da reta (Figura 2).

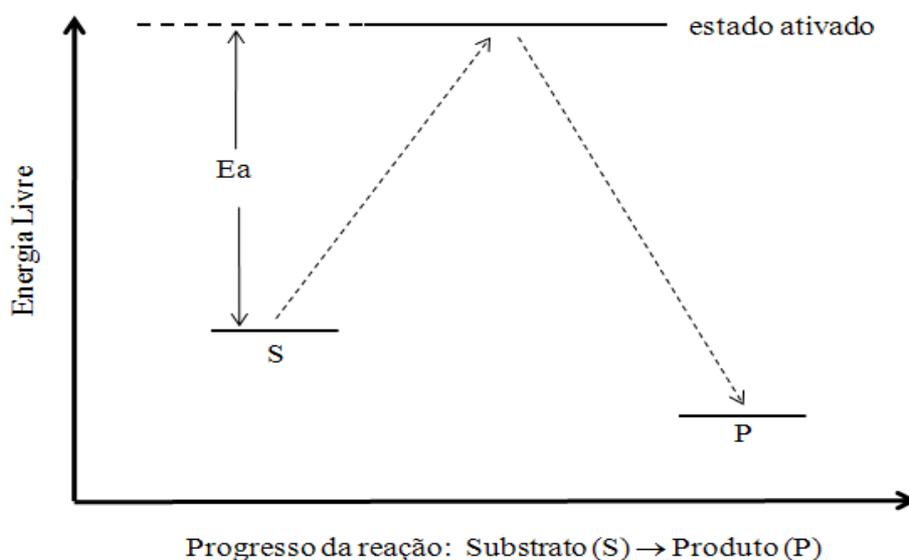


Figura 1 – Esquema dos níveis de energia para o modelo de Arrhenius (Johnson e Thornley 1985).

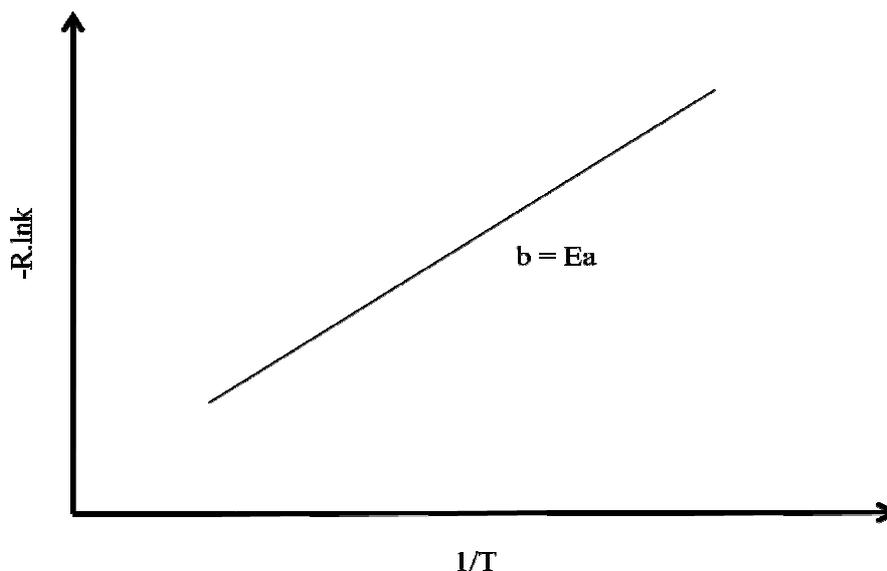


Figura 2 – Ilustração de um gráfico de Arrhenius, mostrando a regressão de $-R.lnk$ sobre a recíproca da temperatura absoluta, com a inclinação da reta correspondendo à energia de ativação (E_a). R = constante dos gases; k = velocidade específica da reação.

Portanto, assumindo-se que um determinado processo ou reação ocorre apenas se as moléculas dos reagentes ultrapassarem uma “barreira” energética representada pela E_a , e que a distribuição da energia entre as moléculas do reagente obedece ao modelo de Boltzmann, ocorrendo apenas por intermédio de choques elásticos, a velocidade da reação obedecerá à lei de Arrhenius e o gráfico de $-R \ln V \times 1/T$, onde V = velocidade do processo, produzirá uma reta de coeficiente angular $b =$ energia de ativação. Deve-se ressaltar também que a equação de Arrhenius descreve sistemas nos quais predomina uma única reação, ou reação mestra, e onde não existe uma temperatura ótima, uma vez que, de acordo com o modelo, a fração de moléculas ativadas decresceria com o aumento da temperatura no intervalo supra-ótimo, produzindo assim uma E_a negativa (Labouriau 1978). Um decréscimo na proporção de moléculas ativadas com a elevação da temperatura implica necessariamente na presença, dentro do sistema, de mecanismos de partição de energia superpostos às colisões moleculares elásticas, um dos requisitos da equação de Arrhenius (Labouriau e Osborn 1984). Assim, Labouriau (1978) concluiu que um modelo baseado inteiramente na distribuição de energia por colisões moleculares aleatórias seria insatisfatório para explicar processos cinéticos com um ótimo de temperatura, como é o caso da germinação de sementes, cuja análise deveria enfatizar a partição da energia no sistema. Por outro lado, Phillip¹⁸ contrapõe que a adição de uma reação concorrente à reação $S \rightarrow P$ – como a desnaturação térmica de uma enzima – ao modelo de Arrhenius, permite que as equações de velocidade exibam uma temperatura ótima. Essa abordagem é apresentada por Johnson e Thornley (1985), que utilizam um modelo baseado na equação de Arrhenius para descrever processos com uma temperatura ótima. O modelo assume que uma enzima pode existir em dois estados, sendo um ativo e

outro inativo. Produtos são formados com a enzima em seu estado ativo ou não desnaturado que, por sua vez, está em equilíbrio com a forma desnaturada ou inativa. Com o aumento da temperatura, o equilíbrio se deslocaria para o estado inativo da enzima. A reação que leva à formação do produto a partir do complexo enzima-substrato (E-S) ativado apresenta uma constante de velocidade, k , que obedeceria à equação de Arrhenius e que é descrita pela equação:

$k = [(Ae^{-E_a/RT})/(1+e^{\Delta S/R} e^{\Delta H/RT})]$, onde F é a energia livre do estado inativo e S é a entropia e H a entalpia. Esse modelo descreve com razoável precisão alguns processos cuja representação gráfica (velocidade vs. temperatura absoluta) mostra um crescimento sigmoidal até um ponto ótimo, seguido de um decréscimo com a continuação do aumento da temperatura (Johnson e Thornley 1985). A escolha dos parâmetros E_a , ΔH e ΔS é feita de modo que inflexão da curva (ótimo) ocorra numa temperatura pré-determinada na qual a velocidade (k) seja máxima. Logicamente, tal modelo não se aplica a processos onde o "ótimo" não se restringe a uma única temperatura.

Considerando-se os estudos até hoje realizados sobre a dependência da germinação de sementes, além de inúmeros processos fisiológicos, os gráficos de Arrhenius – ou, mais propriamente, gráficos de Crozier, pelo fato de serem usadas as velocidades reais – necessariamente apresentam dois "braços", um com valores negativos de energia de ativação (parte decrescente da curva), coincidente com a faixa térmica supra-ótima, e outro com valores positivos de E_a (parte crescente da curva), correspondente às temperaturas infra-ótimas (Figura 3). Desse modo, um modelo baseado numa única reação com uma dada E_a não pode, de fato, explicar as variações da velocidade de germinação ao longo de todo o intervalo térmico, embora, como mencionado anteriormente, a introdução de uma segunda reação de natureza antagônica poderia descrever as velocidades tanto na faixa infra como na supra-ótima, o que ainda estaria – de acordo com Phillip (1984) – dentro dos princípios da teoria da energia de ativação. Assim, se considerássemos apenas o intervalo térmico infra-ótimo, o efeito dessa 'segunda' reação poderia ser desconsiderado, e o modelo da reação única poderia em princípio ser aplicado, desde que o gráfico de Arrhenius produzisse uma reta. Além disso, em alguns trabalhos, dois ou mais segmentos de reta são ajustados ao conjunto de pontos, buscando-se aplicar o modelo a intervalos térmicos parciais, de modo que o gráfico indica uma descontinuidade na E_a (representada por cada uma das intersecções dos segmentos de reta), ou seja, o processo todo seria controlado nesse caso por várias "reações mestras", cada qual com sua própria E_a . Labouriau (1984), por outro lado, questiona que tais descontinuidades no gráfico de Arrhenius muitas vezes não passam de artefatos, sem comprovação estatística; entretanto, nesse trabalho, o autor admite que a temperatura ótima pode ser vista como uma "dobra", com uma reação predominando na região infra ótima e outra na supra ótima.

De qualquer modo, considerando-se as limitações conceituais representadas pelo modelo de Arrhenius, e considerando-se que os casos nos quais os gráficos de Arrhenius eram aparentemente lineares referiam-se apenas às temperaturas infra-

ótimas, Labouriau (1978) explicou a cinética do processo de germinação à luz de um modelo com um arcabouço conceitual menos restritivo do que aquele representado pelo modelo de Arrhenius.

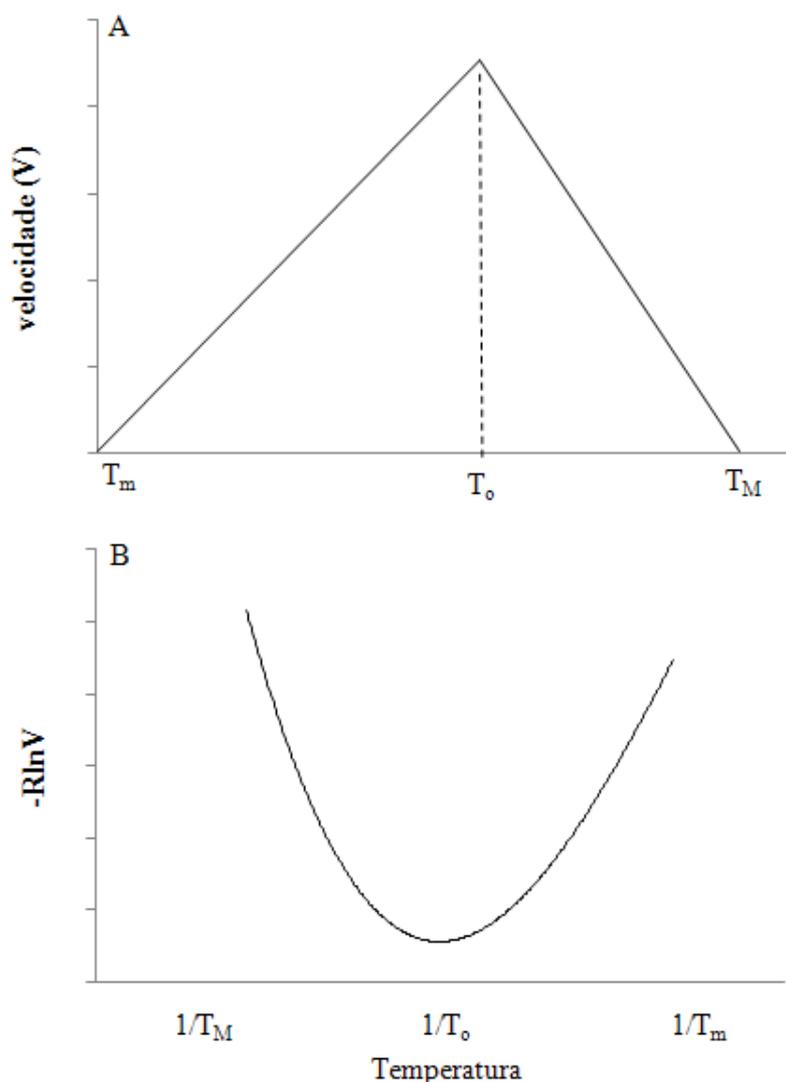


Figura 3 – Gráfico mostrando uma típica relação unimodal entre velocidade de germinação e temperatura, bem como a respectiva curva de Arrhenius (Baseado em Labouriau e Labouriau 1991).

Portanto, um salto importante no estudo da dependência térmica da velocidade de processos fisiológicos foi dado com a substituição da abordagem baseada na energia de ativação por outras, tais como a teoria das velocidades absolutas de reação (Labouriau 1984). Essa teoria nada mais é do que a aplicação às reações químicas da teoria do estado transitório de Eyring (Labouriau 1972b), cuja idéia central é baseada num equilíbrio – referido como “quasi-termodinâmico” – entre um estado basal e um estado ativado (K^*), de modo que a velocidade de reação numa dada temperatura dependa somente da concentração e da velocidade de intercâmbio de K^* (Oliveberg et al. 1995). O modelo é representado, de maneira simplificada, pela equação:

$$k = A \cdot e^{-(\Delta H^*/RT)} \quad (\text{equação 1}),$$

onde ΔH^* é a entalpia de ativação e A corresponde ao fator pre-exponencial de Arrhenius.

A aplicação do modelo pressupõe os seguintes postulados: a) a existência de uma pluralidade de graus de liberdade no sistema, entre os quais a energia disponível é repartida; b) a existência de um requisito energético limiar (ΔG^*) necessário para a formação de um complexo ativado cuja energia potencial é maior do que a dos reagentes e produtos; c) os parâmetros de ativação termodinâmica, ΔH^* (variação de entalpia de ativação padrão) e ΔS^* (variação de entropia de ativação padrão) são constantes e independentes da temperatura e; d) um equilíbrio energético entre o estado ativado e os demais estados do sistema (Labouriau 1978). A idéia de que cada processo depende de um limiar energético ou de uma barreira de energia potencial a ser ultrapassada remete ao conceito da energia de ativação, o que, grosso modo, aproxima o modelo do de Arrhenius.

No caso da germinação, considerando que a ativação das reações que levam ao crescimento do embrião, desde a quiescência até a protrusão radicular, requer uma determinada quantidade de energia livre (ΔG^*), quanto menos energia for consumida por unidade de tempo na ativação do crescimento, mais eficiente será essa ativação. O grau de eficiência estaria, por sua vez, associado à frequência de variação do número de estados do sistema – nem todos diretamente ligados ao crescimento – que competiriam pela energia livre e aumentariam a probabilidade de dissipação dessa energia. A frequência de tais estados e, conseqüentemente, a partição de ΔG^* dentro dos diferentes graus de liberdade – por exemplo, as possíveis conformações de uma enzima – do sistema altera-se com a temperatura, já que os efetadores da partição (as enzimas) são termo-lábeis (Labouriau 1972a). Nos casos em que as “dependências-T” das velocidades (V) de germinação apresentam um ótimo definido, os intervalos em que **V** é função crescente (faixa infra-ótima) e decrescente (faixa supra-ótima) da temperatura devem representar tipos diferentes de partição de energia entre os diferentes processos parciais do sistema. Para que isso possa ser entendido, deve-se considerar o modelo – mencionado acima – de germinação isotérmica que envolve a ativação de um substrato (S) e sua transição para um estado final (P) do processo.

Com base no modelo do estado transitório de Eyring, a velocidade do processo (k), no caso a germinação, pode ser representada pela equação:

$$k = K(k'T/h) \cdot K^* \quad (\text{equação 2})$$

sendo K o coeficiente de transmissão, k' a constante de Boltzman e h a constante de Planck, enquanto que $K^* = e^{-(\Delta G^*/RT)}$. O termo $k'T/h$ representa a taxa de decomposição do complexo ativado E-S, enquanto que K^* é a constante de equilíbrio químico da reação de formação do complexo ativado. Combinando-se as equações de Van't Hoff ($\Delta G^\ddagger = -RT \ln k$) e de Gibbs-Helmholtz ($\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$), sendo T a

temperatura absoluta, R a constante dos gases e ΔH^* e ΔS^* as variações de entalpia e entropia de ativação, respectivamente, obtém-se a partir da equação (2):

$$k = (k^{\prime}T/h).e^{-(\Delta S^*/R)}.e^{-(\Delta H^*/RT)},$$

sendo que o termo $(k^{\prime}T/h).e^{-(\Delta S^*/R)}$ corresponde ao fator A da equação de Arrhenius, (vide equação 1). Lembrando que, no caso, os parâmetros termodinâmicos (ΔH^* e ΔS^*) da formação do complexo ativado são constantes e, portanto, independentes da temperatura, derivando-se k em relação a 1/T, assumindo-se que $\partial(\Delta S^*)/\partial T = 0$, em pressão constante (Labouriau 1972a), obtém-se:

$$\partial(-R.\ln k)/\partial(1/T) = \Delta H^* + RT \text{ (equação 3).}$$

Assim, com base na equação (3), o ΔH^* da reação pode ser obtido a partir de um gráfico de Arrhenius ou de Crozier, com as coordenadas $y = -R.\ln V$ ($V =$ velocidade de germinação) e $x = 1/T$; a declividade da reta representará a $E_a = \Delta H^* + RT$ (Labouriau 1972a, Labouriau e Labouriau 1997). Deve-se enfatizar que esse tratamento das velocidades assume que: a distribuição da energia no sistema não é aleatória (colisões moleculares perfeitamente elásticas), ou seja, a velocidade de um processo fisiológico numa dada temperatura é consequência de uma partição de energia entre vários "graus de liberdade" do sistema; e que a barreira energética de ativação (ΔG^*) engloba tanto transições térmicas (ΔH^*) como de organização (ΔS^*) (Labouriau e Labouriau 1997).

Num estudo realizado com sementes de *Vicia gramínea*, cuja velocidade de germinação é uma função linear da temperatura, com uma região infra-ótima V1 crescente, e uma região supra-ótima (V2) decrescente, e a interseção das retas ocorrendo à temperatura de 19°C (temperatura ótima), Labouriau (1972a) demonstrou que ΔH^* é dependente da temperatura, não sendo possível assumir sua constância no estudo da dependência térmica da germinação. A partir das relações lineares obtidas nos intervalos V1 e V2, e do modelo de Arrhenius ($E_a = \partial(-R.\ln V)/\partial x$), esse autor elaborou equações para a variação de ΔH^* a partir de valores experimentais de velocidade, tanto na faixa infra (V1) como na supra-ótima (V2), usando como parâmetros as temperaturas mínima (T_m) e máxima (T_M) de germinação. Assim, na faixa V1, $\Delta H^*_1 = R.T_m.[T/(T-T_m)]$, e na faixa V2, $\Delta H^*_2 = -R.T_M.[T/(T_M-T)]$, sendo que a variação líquida de entalpia (ΔH^*_n) ao longo de todo o intervalo térmico pode ser representada pela expressão (Labouriau 1972a, 1978):

$$\Delta H^*_n = [RT(\theta - T).(T_m + T_M)]/[(T - T_m).(T_M - T)],$$

onde θ (média harmônica das temperaturas mínima e máxima) = $[(2T_m.T_M)/(T_m + T_M)]$, e T é a temperatura experimental. O gráfico da variação de ΔH^* em relação à temperatura, como ilustrado na Figura 4, mostra que a energia (ou entalpia) de ativação da germinação tende a $-\infty$ à medida que a temperatura tende para T_M , ou seja, E_a é negativa nas proximidades de T_M , significando que o conceito de "barreira energética" deixa de ter sentido em temperaturas supra-ótimas. Em assim sendo, caberia a pergunta: por que então a germinação não é mais rápida em T_M ? A partir dessa questão, Labouriau e Labouriau (1997) propuseram uma extensão aos

postulados da teoria das velocidades absolutas de reação, mostrando que: os processos que ocorrem na faixa supra-ótima são de natureza diferente daqueles no ocorrem na região infra-ótima; ΔH^* e ΔS^* são ambos dependentes da temperatura; e que a barreira de ativação é de natureza entrópica, não energética. Além disso, ao invés de considerar o sistema como em estado de equilíbrio, os autores assumiram que a velocidade do processo fisiológico é uma função diferenciável (suave) da temperatura, com o gráfico de Arrhenius assumindo a forma $\partial A(V)/\partial x = E_a + \Sigma \Delta H^0_{i,r} = E_a^*$, sendo: $x = 1/T$; $\Sigma \Delta H^0_{i,r}$ a soma algébrica das variações de entropia padrão de todas as reações que ocorrem no sistema; e E_a^* a "energia de ativação aparente", que difere de E_a pelo fato de depender de vias bioquímicas situadas além do estado estável. O gráfico dessa função (Figura 3) mostra que nas proximidades de T_M a energia de ativação é negativa, tendendo a $-\infty$ quando T tende a T_M . Nesse caso, assume-se que $\Delta H^0_{i,r}$, assim como $\Delta S^0_{i,r}$ (variação da entropia padrão) são independentes da temperatura, ou seja, o estado de referência do sistema não muda com a temperatura (Labouriau e Labouriau 1997). A curva de distribuição de ΔH^* em função da temperatura (Figura 4), com assíntotas próximas a T_m e T_M , sugerem que em temperaturas extremas, mesmo que a concentração de substrato não seja um fator limitante, o processo cessaria devido a um aumento ilimitado de E_a , ou seja, a limitação da velocidade de germinação em T_m e T_M seria devido a uma demanda de energia acima da capacidade de suprimento energético pelas reações metabólicas exergônicas (Labouriau 1984).

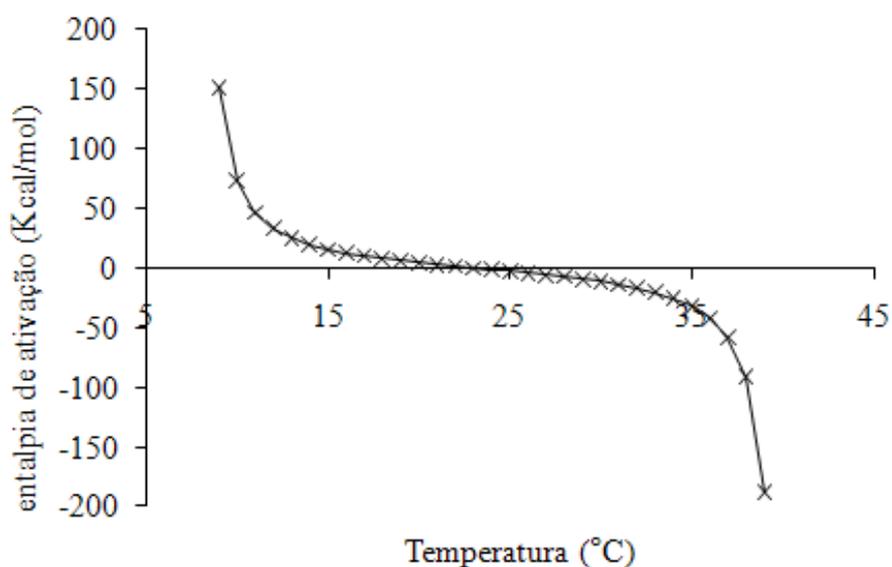


Figura 4 – Variação líquida da entalpia de ativação da germinação (Labouriau 1972, 1978).

A interpretação fisiológica dos sinais opostos de ΔH^* nas faixas infra e supra-ótimas de germinação é proposta por Labouriau (1972a, 1978) e Labouriau e Labouriau (1997). Se ΔH^* é positivo, V aumenta com a temperatura (faixa infra-ótima) e a reação predominante é endotérmica (consome energia), significando que a elevação da temperatura aumenta a concentração do produto P , e a velocidade

global do processo é limitada por processos parciais cujos efeitos aumentam com a temperatura e que são sinérgicos, ou seja, são voltados ao crescimento do embrião. Por outro lado, se ΔH^* é negativo, V diminui com a temperatura e a reação é exotérmica (libera calor), indicando que a velocidade também é limitada por processos favorecidos pela elevação da temperatura, mas cujos efeitos são antagônicos, isto é, a energia térmica mobilizada é desviada para outros processos não ligados ao crescimento embrionário propriamente dito. Portanto, a faixa térmica supra-ótima é consequência da presença de processos parciais "ladrões", os quais apresentam seus próprios parâmetros de ativação, também assumidos como independentes da temperatura (Labouriau e Labouriau 1997).

Considerando-se que ΔH^* é um componente de E_a^* ($E_a^* = \Delta H^* + RT + \Sigma \Delta H^0_i$), a limitação da velocidade por valores elevados de $|\Delta H^*|$ indica a participação de processos de mudanças de fase, tais como congelamento e vaporização de líquidos, e transconformação de proteínas. Mudanças de fase de fosfolípidios de membranas têm sido consideradas um importante mecanismo de limitação da velocidade de crescimento, particularmente em baixas temperaturas, onde as mudanças de fase podem afetar as proteínas da própria membrana. Estudos sobre a dependência térmica da desnaturação protéica sugerem que, em baixas temperaturas (próximo a T_m), muitas proteínas enzimáticas podem estar excessivamente dobradas, de modo que seus centros ativos não são alcançados pelos respectivos substratos, o que inviabiliza a reação (Labouriau e Labouriau 1997). Do mesmo modo, em temperaturas altas, a limitação pode ocorrer devido a transconformações adversas, levando também à perda da capacidade de catálise. Essa hipótese tem sido comprovada por experimentos de germinação em água pesada (D_2O), que atua dificultando o dobramento ou "empacotamento" das moléculas, mostrando que o D_2O causa um deslocamento de T_m e T_M em direção a temperaturas mais elevadas (Labouriau 1980). Além do deutério, a manutenção da conformação protéica pode ser favorecida por tratamento com glicerol e outros poli alcoóis, o que teoricamente deve favorecer um aumento da T_M para a germinação (Labouriau e Labouriau 1997). Outro processo que apresenta valores elevados de ΔH^0 e ΔS^0 , e que também pode ser afetado por baixas temperaturas, é a organização da tubulina em microtúbulos, de modo que valores de ΔH^* similares àqueles de ΔH^0 da formação de microtúbulos podem indicar esse como um dos processos parciais sinérgicos atuando na faixa infra-ótima de germinação (Labouriau e Labouriau 1997).

Em geral, valores de $|\Delta H^*|$ a partir de 30 Kcal.mol⁻¹ são características de processos envolvendo termo-transconformação protéica, os quais podem ser sinérgicos ($\Delta H^* > 0$) ou antagônicos ($\Delta H^* < 0$). Valores negativos de ΔH^* – estimados a partir de gráficos de Arrhenius ou Crozier da velocidade – devem ocorrer já a partir da temperatura ótima, sugerindo que termodesnaturação competitiva começa a ocorrer ainda em T_o , o que é indicado pelo aparecimento de proteínas de choque térmico (HSP), cuja síntese é induzida por desnaturação protéica (Labouriau e Labouriau 1997).

Valores de $|\Delta H^*| \leq 12 \text{Kcal.mol}^{-1}$, que são detectadas por intermédio dos gráficos de Arrhenius e Crozier apenas nas proximidades da(s) temperatura(s) ótima(s), indicam que a velocidade é limitada por processos de difusão, os quais, em nível macroscópico, podem ser exemplificados pelo processo de hidratação de sementes (embebição). Desse modo, a limitação da germinação por processos de difusão não deve ocorrer próximo às temperaturas extremas, o que tem sido experimentalmente demonstrado por intermédio da comparação das velocidades de germinação de sementes intactas e escarificadas (Cardoso 1992, Labouriau 1970). Vale lembrar que a escarificação remove pelo menos parte da barreira, representada pelos tegumentos e envoltórios em geral, à difusão de material entre semente e o meio externo. Portanto, a entalpia de ativação nos diz o quanto uma dada reação química ou processo é sensível à temperatura. Em geral, processos puramente passivos, como a embebição – resultado da difusão passiva de moléculas de água devido a um gradiente de potencial hídrico – são menos sensíveis à variação de temperatura do que processos metabólicos. Daí a inferência de que a germinação tende a ser limitada por fenômenos de difusão na faixa térmica ótima, onde as velocidades de germinação em geral variam pouco com a mudança de temperatura.

Como delineado acima, o processo global de germinação é de caráter endergônico, não ocorrendo a menos que certo limiar energético ΔG^* seja alcançado graças ao suprimento energético representado pelas chamadas “substâncias de reserva” da semente. Isso deve requerer um acoplamento entre o metabolismo e o crescimento do embrião, o que implica na proporcionalidade entre a velocidade de germinação isotérmica e a taxa de reação específica (k) da reação exergônica correspondente (Labouriau 1978). Labouriau (1978) analisou esse acoplamento energético em relação ao padrão de crescimento do embrião e, assumindo ΔG^* como uma função linear do tempo, propôs que o crescimento do embrião na semente germinante deveria corresponder a uma sigmóide de Gompertz: $W(t) = W(0). \exp\{-[ve(0)/K].[-1 + \exp(-Kt)]\}$, de parâmetros: $W(0)$ = tamanho do embrião na semente quiescente; $ve(0)$ = taxa de crescimento específico na semente quiescente; e K = taxa de crescimento do embrião no ponto de inflexão da sigmóide, correspondendo à velocidade média isotérmica de germinação. Daí a relevância, em termos fisiológicos, desse parâmetro como uma medida da germinação isotérmica.

COMUNICAÇÃO TÉRMICA, INFORMAÇÃO E SINCRONIZAÇÃO

Sempre levando em consideração os pressupostos mencionados acima, é possível que processos de termodenaturação (indicados por valores elevados de ΔH^*) levem a um aumento da “desorganização” do sistema, fazendo com que a mensagem ou sinal ambiental (no caso a temperatura) não seja percebido de maneira homogênea pelas sementes da população, produzindo uma distribuição temporal aleatória da germinação. Estudos da dependência térmica da germinação, bem como da ação de outros fatores ambientais, como luz e água, tem mostrado que em condições menos “favoráveis” a distribuição da germinação ao longo do tempo tende à polimodalidade e à dispersão, tornando-se, portanto, mais aleatória e menos sincronizada.

Sendo a velocidade de germinação dependente da temperatura, a distribuição das frequências de germinação isotérmica deve variar dependendo da temperatura. A análise de tais distribuições pode indicar como o sinal térmico é percebido pela semente, ou seja, como se dá a "comunicação térmica" entre o efetuator do crescimento (o embrião) e o meio. Tal comunicação pode ser quantificada por intermédio de um valor de "incerteza" (U), computado da expressão: $U = \sum (f_i \cdot \log_2 f_i)$ (Labouriau 1978, Labouriau e Agudo 1987), sendo f_i a frequência relativa de germinação. Mas, o que termos como informação, incerteza e redundância podem contribuir para o conhecimento do processo fisiológico da germinação?

De acordo com Shannon ²⁰ um sistema de comunicação é composto basicamente de cinco partes:

- 1) uma fonte de informação, que produz a mensagem ou sequência de mensagens a serem transmitidas ao terminal receptor. A mensagem pode ser de vários tipos, como um sequência de letras ou uma função do tempo, $f(t)$;
- 2) um transmissor, que codifica a mensagem, produzindo um sinal passível de ser transmitido;
- 3) o canal, representado simplesmente pelo meio através do qual o sinal trafega;
- 4) um receptor, que decodifica o sinal reconstituindo a mensagem original;
- 5) o destinatário, pessoa ou coisa a quem a mensagem é enviada.

Para o destinatário que "espera" uma mensagem, informação representa um decréscimo de incerteza (U), ou seja, o aumento da informação corresponde a uma diminuição de U . A incerteza é definida pela expressão $U = -\log_2 (p)$, sendo p a probabilidade de aparecimento de um símbolo. Assim, numa máquina capaz de emitir três símbolos (por exemplo, A, B e C) com probabilidades iguais ($A = 1/3$, $B = 1/3$ e $C = 1/3$), a incerteza seria aproximadamente 1,585. Caso tal máquina emita o símbolo A, por exemplo, nossa incerteza diminuirá, passando para 1, já que restaram apenas 2 símbolos. A questão também pode ser colocada da seguinte maneira: nossa surpresa ao ver o símbolo i^{th} é expressa pela fórmula $u_i = -\log_2 (p_i)$. A "surpresa média", considerando toda a sequência de símbolos produzida pela máquina, será $H = -\sum p_i \cdot \log p_i$ bits/símbolo. Observa-se também que, no caso de símbolos equiprováveis, a fórmula pode ser simplificada para $H = \log_2 M$, sendo M o número de símbolos. Assim, no caso de nossa máquina, H será máxima se os três símbolos apresentarem probabilidades iguais de aparecerem, como no exemplo acima.

Qual o significado, afinal, de "bits/símbolo"? Suponha os símbolos A, C, G e T, cujas probabilidades (p_i) sejam $P_A = 1/2$, $P_C = 1/4$, $P_G = 1/8$ e $P_T = 1/8$. As "incertezas" ou "surpresas" ($= -\log_2 p_i$) de cada símbolo seriam: $u_A = 1$ bit; $u_C = 2$ bits; $u_G = 3$ bits; e $u_T = 3$ bits. Nesse caso, a surpresa ou incerteza média será $H = (1/2)1 + (1/4)2 + (1/8)3 + (1/8)3 = 1,75$ bits/símbolo, ou seja, serão necessários em média 1,75 dígitos binários por símbolo para se codificar uma sequência (por exemplo, ACATGAAC). Isso quer dizer que tal sequência não poderia ser codificada

usando-se um número menor de dígitos/símbolo. Nota-se também que se todos os símbolos apresentarem a mesma probabilidade de ocorrência (1/4), então $H = 2$ bits/símbolo. Assim, no segundo caso cada símbolo carrega "a priori" menos informação do que no primeiro, já que o receptor teria mais "trabalho" em decodificar a mensagem.

A informação (I), definida como um decréscimo da incerteza, corresponde à diferença entre a incerteza antes (H_B) e depois (H_A) do ato de comunicação. No exemplo da máquina mencionado anteriormente, a emissão do símbolo A, por exemplo, implica numa "quantidade" de informação $I = H_B - H_A$, ou, $I = 1,585 - 1 = 0,585$. Assim, sendo H (incerteza) e I (informação) grandezas inversamente proporcionais, quanto maior a quantidade de bits/símbolo, menor será a informação associada a esse símbolo, já que o receptor teria mais "trabalho" em decodificar a mensagem.

Mas por que haveria incerteza? Há incerteza porque não estamos certos se a mensagem enviada corresponde exatamente à mensagem recebida, e isso está relacionado à quantidade de ruído na transmissão da mensagem. Shannon (1948) dá o exemplo de um sistema com dois símbolos (0, 1) equiprováveis transmitidos a uma taxa de 1 bit/segundo. Essa é a incerteza "antes" (H_B). Considere-se agora que a probabilidade do símbolo "0" transmitido ser efetivamente recebido seja 0,99, enquanto que a probabilidade do "1" ser recebido seja 0,01 (considera-se que, se um "1" é recebido, esses valores se invertem). Sendo tais probabilidades, e aplicando-se a fórmula $H = -\sum p_i \cdot \log p_i$, a incerteza ("surpresa") após o recebimento de um símbolo é $H_A = -0,99 \log_2 0,99 - 0,01 \log_2 0,01 = 0,081$. Desse modo, a taxa real de transmissão é $I = 1 - 0,081 = 0,919$ bits/segundo. Supondo-se que não haja ruído, a quantidade de informação comunicada é igual à incerteza antes da comunicação. Os índices H ("surpresa" média) e U (incerteza) são equivalentes, ainda que a rigor apresentem uma diferença conceitual importante: a incerteza existe *antes* do recebimento da mensagem, enquanto que a surpresa existe *após* o recebimento. Na prática, é preciso reiterar, H_A equivale à incerteza (U) após a comunicação ou amostragem, enquanto que H_B equivale à incerteza antes da comunicação ou amostragem.

Em sistemas físicos a medida da incerteza é chamada entropia, conceito que na mecânica clássica mede o grau de desordem num sistema. Na teoria matemática da comunicação de Shannon, H pode ser reconhecida dentro da fórmula de entropia (S) definida no teorema de Boltzmann ($S = k \cdot \log_n W$, onde: k é a constante de Boltzmann; e W a probabilidade do sistema existir num determinado estado). Reconhecendo a conexão entre as definições de incerteza e entropia, Shannon (1948) chamou seu índice H de "entropia informacional". Como já vimos, um postulado da teoria da informação prova que a entropia informacional é máxima quando todos os sinais ocorrem com a mesma frequência, situação em que a desorganização do sistema é máxima. A entropia informacional pode ser medida tanto na forma de bits, caso \log_2 seja usado na fórmula de U , ou nats, no caso de se usar logaritmo natural, expressando a quantidade de organização (ou

desorganização) de uma dada distribuição, seja de objetos ou unidades de informação.

A germinação pode ser analisada em termos da distribuição de suas taxas ao longo do tempo, o que permite agrupar as sementes em diferentes classes de frequência. No caso do estudo da dependência da temperatura da germinação de sementes, leva-se em consideração a distribuição de frequências relativas de germinação ao longo do período de incubação isotérmica das sementes. Tais agrupamentos ou classificações podem ser descritos por intermédio de um código binário (digamos, 1 = germinação; 0 = ausência de germinação), o que requer uma determinada quantidade de dígitos. Desse modo, se n_i sementes germinaram no intervalo i , são necessários $x_i = \log_2 n_i$ dígitos binários para codificar a quantidade n_i de germinações (tratadas como eventos independentes) nesse intervalo e, ao fim do experimento, quando $N = \sum n_i$ sementes tiverem germinado, uma média $x = (\sum n_i \cdot x_i) / \sum n_i$ é necessária para descrever as germinações sucessivas. Fazendo-se as substituições, isso é o mesmo que $x = (\sum n_i \cdot \log_2 n_i) / N$. Se todas as n sementes apresentarem a mesma probabilidade de germinar no mesmo intervalo de tempo, ou melhor, germinarem no mesmo intervalo de tempo, então o número necessário de dígitos para classificar a sincronização será $x' = \log_2 N$, que representa a máxima capacidade do código e máxima sincronização (Labouriau e Valadares 1976). Por exemplo, num experimento onde germinaram um total de 4 sementes ($N = 4$), sendo as germinações distribuídas de acordo com o Quadro abaixo:

$$x = [(0 \cdot \log_2 0) + (4 \cdot \log_2 4) + (0 \cdot \log_2 0)] / 4 = \log_2 4$$

Contagem	Número de germinações (n_i)
1ª	0
2ª	4
3ª	0

Assim, Labouriau e Valadares (1976) propuseram um índice para medir a sincronização da germinação de sementes individualizadas, expresso pela equação $E = \log_2 N - (\sum n_i \cdot \log_2 n_i) / N$. Chamando-se o membro $\log_2 N$ - que corresponde à incerteza máxima - de x' e o membro $(\sum n_i \cdot \log_2 n_i) / N$ - que representa a incerteza atual - de x , quanto menor a diferença entre x' and x , ou seja, quanto *menor* o índice E , mais sincronizada será a germinação. Por outro lado, quanto menor o valor de E , menor a informação/incerteza contida na "mensagem", representada pela distribuição das frequências de germinação. Além disso, se E expressa as frequências (f_i) de germinação isotérmica ($f_i = n_i / N \therefore n_i = N \cdot f_i$), substituindo-se n_i na fórmula de E obtém-se $E = -\sum f_i \cdot \log f_i$, que é idêntica à fórmula de entropia informacional de Shannon, $H = -\sum p_i \cdot \log p_i$, nesse caso associada à distribuição de frequências de germinação. Em trabalhos posteriores, Labouriau (1984) passou a usar a notação U , de incerteza, ao invés de E .

Desse modo, o índice U pode expressar informação, entropia, sincronização ou incerteza, mas como na prática se contam sementes efetivamente germinadas, ou seja, trabalha-se com frequências de germinação e não com probabilidades,

entendemos que a palavra *informação* define melhor o índice U , muito embora termo 'incerteza' seja o mais comumente usado. O termo "sincronização" talvez seja o menos apropriado para se descrever o índice U , já que a sincronização propriamente dita é a recíproca de U .

Fazendo-se novamente uma analogia entre U (sincronização = $U = x' - x$) e I (informação = $I = H_B - H_A$), a incerteza máxima da germinação (x') – quando todas as sementes da população apresentariam a mesma probabilidade de germinarem num determinado intervalo de tempo – corresponderia à incerteza "antes" (H_B) na teoria da informação, ao passo que incerteza "depois" (H_A e x) seria revelada pelo recebimento da mensagem ou pela amostragem. Em ambos os casos estamos medindo o decréscimo da incerteza, ou seja, medindo a informação. A máxima sincronização da germinação ($U = 0$) corresponderia assim à menor quantidade de informação média por sinal, acompanhada, por outro lado, de maior organização e mais forma na "mensagem".

O sistema "semente" é composto de um embrião, de uma fonte de energia potencial (material de "reserva") e de uma interface com o meio externo (o tegumento). Ainda dentro da abordagem descrita acima, a natureza da comunicação térmica entre as sementes e o meio ambiente poderia também ser analisada por intermédio de testes de aderência das distribuições de frequência da germinação isotérmica às respectivas normais ajustadas (Labouriau e Valadares 1976) admitindo-se que, com o aumento do tamanho da amostra, a distribuição das velocidades médias de germinação tende à normalidade. No caso de distribuições contínuas uni dimensionais de média aritmética x e desvio padrão σ , a condição de máxima entropia é verificada na distribuição normal, conforme demonstrado por Shannon (1948). A entropia de uma distribuição desse tipo é dada pela fórmula $H(x) = \log \sqrt{2\pi e} \sigma$, sendo e a base dos logaritmos naturais e σ o desvio padrão da amostra. Isso implica numa relação direta entre desvio (variância) e entropia (incerteza) da distribuição, com a máxima variância produzindo a máxima entropia. Também de acordo com Shannon (1948), para um determinado desvio, o ruído térmico aleatório ("ruído branco") apresenta a máxima entropia possível. A distribuição com máxima incerteza corresponde, pois, ao estado de máxima entropia, ou seja, as unidades estão distribuídas totalmente ao acaso, exibindo padrão normal (gaussiano) de distribuição e redundância máxima.

E o que representa a redundância? Imaginando-se um alfabeto com número k de símbolos, a entropia máxima num gerador de símbolos corresponde a $\log k$, condição em que todos os símbolos têm a mesma probabilidade "a priori". A razão entre a entropia de um processo (em relação a esse alfabeto) e a entropia máxima é assim um valor que pode variar de zero a 1. Se a razão é próxima de 1 o processo é praticamente ramdomico, e a quantidade de informação por símbolo (letra, no caso) é baixa (lembrar que quanto maior a incerteza menor a informação), já que muitas letras serão necessárias para se passar uma determinada quantidade de informação. Se a razão se aproxima de zero, então o conteúdo de informação por letra é alto, e a mesma quantidade de informação é passada com uma quantidade menor de letras.

A redundância (R) de um processo é essa razão subtraída da unidade, sendo definida pela expressão $R = 1 - (H/\log k)$, que indica em porcentagem aquilo que é dito "em excesso" numa mensagem. Comparando-se mensagens de igual tamanho, no primeiro caso (razão de entropia = 1) a informação está dispersa por toda a mensagem e a redundância é baixa, enquanto que no segundo caso (razão = zero) a informação está concentrada numa pequena porção da mensagem, sendo que a mensagem como um todo contém muita redundância, ou repetição.

Considerando que a temperatura do meio seja mantida dentro de uma faixa estreita, a incerteza em relação às velocidades de germinação isotérmica deve decorrer de efeitos da entropia no meio utilizado na transmissão do sinal térmico, que atua como um canal de comunicação térmica. No caso da distribuição de frequências de germinação isotérmica – e levando-se em conta as respectivas variâncias –, a máxima informação (I_{\max}) – para evitar alguma confusão, vou empregar o termo *informação* (= decréscimo de entropia) ao invés de incerteza/entropia – é calculada, de acordo com Labouriau e Valadares (1976), por intermédio da fórmula: $I_{\max} = \frac{1}{2} \log_2 (2\pi e s_t^2)$, sendo $e = 2,718$ e s_t^2 = variância do tempo médio. Nesse caso, a redundância (R) representa a razão entre a informação atual ($I = -\sum f_i \cdot \log f_i$), associada à uma dada distribuição de frequências, e sua informação máxima (I_{\max}), subtraída da unidade, ou seja, $R = 1 - (I/I_{\max})$. A redundância pode ser expressa em porcentagem: $(100 \cdot [1 - I/I_{\max}])$. Conceitualmente, pode-se dizer que informação mede o decréscimo da incerteza, enquanto que redundância mede o decréscimo da informação. No caso de *Catharanthus roseus* (Cardoso 1999) e *Cucumis anguria* (Santos e Cardoso 2001), os índices de sincronização da germinação isotérmica foram mais elevados próximo às temperaturas extremas, mostrando que a germinação se torna menos sincronizada e revelando um aumento da entropia informacional nessas temperaturas, ao passo que as redundâncias (R) foram menores nas proximidades das temperaturas extremas, e maiores na faixa térmica ótima. Dentro da analogia entre a unidade de informação (bit) e uma semente germinada, R baixa indica dispersão da informação (germinação), enquanto que R alta sugere concentração da germinação.

Assim, estudos envolvendo a comunicação envolvida no controle térmico da germinação podem permitir inferências sobre a natureza do processo de germinação, bem como novas abordagens e interpretações para os estudos envolvendo a semente e sua relação com o ambiente operacional.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante a realização do presente trabalho

REFERÊNCIAS

CARDOSO, V.J.M. Temperature dependence on seed germination of a weed (*Sida glaziovii* - Malvaceae). *Naturalia*, v.17, p. 89-97, 1992.

- CARDOSO, V.J.M. Thermal-dependence of the germination of *Catharanthus roseus* seeds. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, v.11, n.1, p. 41-49, 1999.
- CARDOSO, V.J.M. Germinação. In: Kerbauy, G.B. (Coord.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 384-408.
- JOHNSON, I.R.; THORNLEY, J.H.M. Temperature dependence of plant and crop processes. *Annals of Botany*, v.55, p. 1-24, 1985.
- LABOURIAU, L.G. On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* I. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, v.42, n.2, p. 235-262, 1970.
- LABOURIAU, L.G. On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* II. An analysis of the temperature dependence of the seed germination rate. *Anais Academia Brasileira de Ciências* v.44, p. 477-534, 1972a.
- LABOURIAU, L.G. A germinação de sementes como problema de termobiologia. *Sobretirc de las Memorias de Symposia Del I Congreso Latioamericano y V Mexicano de Botanica*, Diciembre. Sociedad Botanica de Mexico, Mexico, p. 321-342, 1972b.
- LABOURIAU, L.G. Seed germination as a thermobiological problem. *Radiation and Environmental Biophysics*, v.15, p. 345-366, 1978.
- LABOURIAU, L.G. Effect of deuterium oxide on the lower temperature limit of seed germination. *Journal of Thermal Biology*, v.5, p. 113-117, 1980.
- LABOURIAU, L.G. Comments on "Seed germination as a thermobiological problem" a reply. *Radiation and Environmental Biophysics*, v.23, p. 298-304, 1984.
- LABOURIAU, L.G. *A Germinação das Sementes*. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983. 174p.
- LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, v.59, p. 37-56, 1987.
- LABOURIAU, L.G.; LABOURIAU, I.S. The Arrhenius plot of a physiological rate processes is never linear. *Ciência e Cultura Journal Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.43, p. 363-369, 1991.
- LABOURIAU, L.G.; LABOURIAU, I.S. Physiological rate processes form the point of view of absolute reaction rate theory. *Ciência e Cultura Journal Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.49, n.3, p. 177-189, 1997.
- LABOURIAU, L.G.; OSBORN, J.H. Temperature dependence on germination of tomato seeds. *Journal of Thermal Biology*, v.9, n.4, p. 285-294, 1984.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.F.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. *Anais Academia Brasileira Ciências*, v.48, n.2, p. 263-284, 1976.
- OLIVEBERG, M.; TAN, Y.J.; FERSHT, A. R. Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. *Proceedings National Academy Sciences USA*, v.92, p. 8926-8929, 1995.
- PHILLIP, J.E. Comments on "Seed germination as a thermobiological problem". *Radiation and Environmental Biophysics*, v.23, p. 295-297, 1984.
- SANTOS, D. L.; CARDOSO, V.J.M. Thermal-biological aspects of the seed germination of *Cucumis anguria* L: influence of the seed coat. *Revista Brasileira de Botânica*, v.24, n.4, p. 435-440, 2001.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technology Journal*, v.27, p. 379-423, 1948.



Naturalia – eISSN:2177-0727 - ISSN: 0101-1944 - UNESP, Rio Claro, SP, Brasil
Licenciada sob [Licença Creative Commons](#)