**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Humberto Antunes de Almeida Filho

**Redes complexas em sistemas celulares e moleculares de
plantas**

São Carlos

2018

Humberto Antunes de Almeida Filho

**Redes complexas em sistemas celulares e moleculares de
plantas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Odemir Martinez Bruno

Versão corrigida

**São Carlos
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Almeida Filho, Humberto Antunes de
Redes complexas em sistemas celulares e moleculares de plantas / Humberto Antunes de Almeida Filho; orientador Odemir Martinez Bruno - versão corrigida -- São Carlos, 2018.
115 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Estômatos. 2. Redes metabólicas. 3. Plantas. I. Martinez Bruno, Odemir, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de polímeros do IFSC especialmente a Dra Débora Gonçalves pelo suporte com equipamentos disponíveis nos laboratórios do grupo.

Ao grupo de computação interdisciplinar pela colaboração em vários trabalhos desenvolvidos, especialmente ao professor Odemir Martinez Bruno e a doutoranda Jeanneth Machicao pela ajuda com programação e desenvolvimento do trabalho com redes complexas.

Agradeço também aos egressos do grupo de computação interdisciplinar Marcos Willian da Silva Oliveira, Nubia Rosa, João Florindo e Dalcimar Casanova pela contribuição com a programação de vários algoritmos potencialmente úteis na biologia vegetal. Agradeço a Dra Rosana Marta Kolb pela sua colaboração com a formação em Botânica e sugestões ao trabalho.

Aos jardineiros do campus de São Carlos da Universidade de São Paulo e aos funcionários da limpeza do Instituto de Física de São Carlos.

A minha família sobretudo pais e irmãos. Humberto Antunes de Almeida, Maria das Graças, Ana Flávia Almeida e Leonardo Cordeiro e também aos meus tios Rosilene e Rita Cordeiro e avós Rosalvo Souza e Marlene cordeiro.

“ O fundamento do tempo é a memória.”
Gilles Deleuze

RESUMO

ALMEIDA FILHO, H. A. **Redes complexas em sistemas celulares e moleculares de plantas**. 2018. 115p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Células estomáticas e reações metabólicas de plantas foram modelados por meio da teoria dos grafos neste trabalho; a distância entre estômatos vizinhos na folha foi adotada como parâmetro utilizado para a conectividade em redes onde os estômatos foram definidos como nodos. A direção da formação de produtos e substratos em reações metabólicas determinou a conectividade nas redes metabólicas, onde cada metabólito foi definido como um nodo. As redes de estômatos foram capazes de gerar uma grande quantidade de informação geométrica associada à distância entre os estômatos. Estas medidas se mostraram uma poderosa ferramenta para avaliar a plasticidade fenotípica em folhas de plantas. A adaptação de plantas a condições ambientais extremas, como altas taxas de umidade e grandes variações no tempo de exposição à luz, puderam ser quantificadas por parâmetros de redes. Parâmetros topológicos globais das redes metabólicas mostraram que elas possuem propriedades estatísticas e topológicas de redes livre escala, como nos seres vivos em geral. Entretanto, alguns parâmetros topológicos locais das redes como a medida hub-score, geram vetores de características que, se comparados entre plantas, geram informação filogenética. Além disso, nós comprovamos que é possível construir modelos que sugerem uma organização geral para o metabolismo, por meio de algoritmos de conectividade hierárquica. O algoritmo de k -cores foi usado para gerar camadas de conectividade nas redes metabólicas. A atribuição química dos metabólitos ao longo das camadas k -core, mostra que a hierarquia de conexões está associada a especialização do metabolismo. Isto sugere que o algoritmo também gera informação sobre a evolução da maquinaria metabólica. Portanto, o modelo para conectar elementos de uma rede metabólica adotado neste trabalho, traz informações naturais sobre as plantas, o que sugere que exista parâmetros físicos das reações metabólicas representados pelo modelo.

Palavras-chave: Estômatos . Redes metabólicas. Plantas

ABSTRACT

ALMEIDA FILHO, H. A. **Complex networks at celular and molecular systems from plants.** 2018. 115p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Stomatic cells and metabolic reactions were modeled by graph theory in this work. The distance between stomata was adopted as connectivity parameter in the networks where stomata were defined as nodes. The direction of formation from products and substrates in the metabolic reactions, determined the connectivity from the metabolic networks, where each metabolite was defined as a node. The networks of stomata were able to generate a large amount of geometric information based at distance between the stomata. These measures represented a powerful tool to evaluate the phenotypic plasticity in leaves of plants. Global topological parameters from plant the metabolic networks revealed that plant metabolic networks has the topology of free scale networks, as in living beings in general. However, some local topological parameters of the networks such as the hub-score, can be organized as characteristic vectors with differential phylogenetic information. In addition, we have shown that it is possible to construct models that suggest a general organization for the metabolism through algorithms with iterative percolation from network connectivity. The k -cores algorithm was used to generate layers of connectivity in the metabolic networks. The chemical assignment of the metabolites along the k -core layers shows that the hierarchy of connections is associated with specialization of metabolism. This suggests that the algorithm also generates information about the evolution of the metabolic machinery. Therefore, the model used to connect elements of the metabolic networks adopted in this work, brings natural information about the plants, which suggests that there are physical parameters of the metabolic reactions represented by the model.

Keywords: Stomata. Metabolic Networks. Plant.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Revisão bibliográfica	17
2	REDES COMPLEXAS	21
2.1	Redes e padrões de estômatos	27
3	EXPERIMENTOS E RESULTADOS COM ESTÔMATOS	29
3.1	Experimentos	29
3.1.1	Condições de crescimento e aclimação de plantas	29
3.1.1.1	<i>Ctenante Openheimiana</i>	30
3.1.1.2	<i>Callisia repens</i>	30
3.1.2	Microscopia e Morfometria de estômatos	30
3.1.2.1	Microscopia	30
3.1.2.2	Morfometria	31
3.1.2.2.1	Cálculo de frequência e áreas estomáticas em imagens	31
3.1.2.2.2	Medida de distâncias entre estômatos	32
3.2	Modelagem de grafos a partir de estômatos	32
3.2.1	Medidas em redes de estômatos	35
3.3	Resultados	36
3.3.1	Morfometria	36
3.3.2	Plasticidade morfométrica dos estômatos induzida por mudança ambiental	43
3.4	Redes de estômatos	46
4	REDES METABÓLICAS	57
4.1	Proposta e motivação	57
4.2	Metodologia	57
4.2.1	Base de dados	57
4.2.2	Modelo para construção das redes metabólicas	58
4.2.3	Medidas de topologia global	59
4.3	Resultados	59
4.3.1	Redes metabólicas	59
4.3.2	Tamanho das redes	60
4.3.3	Topologia global das redes	61
5	PADRÕES EM REDES METABÓLICAS	63
5.1	Proposta e motivação	63
5.2	Metodologia	63

5.2.1	Classificação taxonômica das plantas contidas na base de dados	63
5.2.2	Reconstrução filogenética baseada em 78 genes de cloroplasto.	65
5.2.3	Medidas topológicas locais	65
5.2.4	Extração de características e filogenia	66
5.3	Resultados	68
5.3.1	Topologia local e filogenia	68
6	TOPOLOGIA DA MAQUINARIA METABÓLICA	73
6.1	Proposta e motivação	73
6.2	Metodologia	73
6.2.1	Decomposição de redes metabólicas em k -cores	73
6.2.2	Atribuição química e conectividade nos k -cores	76
6.2.3	Classificação e atribuição de metabólitos nos k -cores	76
6.2.4	Atribuição de metabólitos do k -core máximo nas reações metabólicas . . .	77
6.3	Resultados	77
6.3.1	Integração do metabolismo ao k -core central	79
6.3.2	Módulos e k -cores	80
6.3.3	Distribuição e atribuição de classes nos k -core	82
7	CONCLUSÃO	87
7.1	Artigos publicados	90
7.2	Artigos submetidos	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES	99
	APÊNDICE A – APÊNDICE(S)	101
A.1	Achados empíricos	101
A.1.1	A plasticidade de cor em <i>Oxalis atropurpurea</i>	101
A.1.2	Alta infestação por protozoários em plantas invenenadas por NaF	106
A.1.3	Exposição de plantas <i>Tradescantia minima</i> a NaF	107
A.1.4	Protozoários em inquilinismo com ácaro	107
A.1.5	Vermes emergindo de estômatos	108
A.1.6	Paredes celulares verdes na epiderme de <i>Ctenante oppenheimiana</i>	108
	ANEXOS	111
	ANEXO A – REDES METABÓLICAS DE PLANTAS	113

A.1	Base de dados de reações Plantcyc	113
A.2	Número de metabólitos e reações	114
A.3	Medidas topológicas globais	115

1 INTRODUÇÃO

As plantas proveem a maior parte do carbono fotossinteticamente fixado no planeta e são a base de muitas cadeias alimentares na terra.¹ Entre as plantas podemos incluir as plantas floridas (angiospermas), coníferas e outras gimnospermas, samambaias, licopódios, briófitas, musgos e algas verdes.²

Na superfície terrestre evoluiu a 400 milhões de anos, juntamente com a adaptação das plantas para a saída do ambiente aquático, um tipo de célula especializada denominada estômato. Ele apresenta uma pequena abertura denominada ostíolo; a abertura e fechamento do ostíolo faz com que os estômatos funcionem como uma espécie de válvula que controla a troca gasosa nas plantas, regulando a perda de água via transpiração bem como a assimilação de CO_2 e liberação de O_2 durante a fotossíntese.³

A natureza sésstil das plantas as torna susceptíveis a variações ambientais impingidas pelas condições locais. Os estômatos são, portanto, fundamentais para a adaptação das plantas ao meio ambiente. Portanto, a quantificação da distribuição de estômatos sobre a epiderme de folhas é útil como ferramenta de observação das respostas celulares geradas por fatores ambientais. Assim, tem-se relacionado o desenvolvimento e padrão de estômatos sobre a epiderme de folhas, com as alterações ambientais.⁴ O número de estômatos por unidade de área de folha, também conhecido por densidade estomática, muda de acordo com os fatores ambientais como quantidade de luz ou concentração de CO_2 na atmosfera. Os sinais celulares que levam a estas alterações tem sido muito investigados⁵. Sabe-se que em muitas espécies de plantas, a densidade estomática é menor se existe maiores concentrações de CO_2 em seu ambiente de crescimento.⁶ Portanto, plantas crescidas em reduzidos níveis de CO_2 , tem maiores densidades estomáticas do que aquelas crescidas nas concentrações de CO_2 atmosféricas observadas nos dias atuais. Sabe-se também que a luz controla a densidade estomática. Muitos trabalhos tem mostrado que folhas de plantas crescidas sob altos níveis de exposição a luz tem densidades estomáticas aumentadas.⁷ Todavia, a quantificação da densidade estomática, por si, é uma medida parcial das alterações no padrão de estômatos sobre a epiderme, já que ela não quantifica mudanças geométricas sofridas na camada celular. Desta forma, padrões de distribuição estomática podem estar correlacionados a alterações ambientais. Alguns trabalhos tem analisado como padrões de distribuição de estômatos variam de acordo com as condições ambientais, por meio de medidas em grafos.⁸ Tem-se observado que quantificações baseadas em descritores de redes, conseguem discernir grupos experimentais de plantas expostas a determinadas condições ambientais com maior precisão do que as medidas de densidade estomática por si. Desta forma, a modelagem das camadas de células estomáticas sobre a epiderme por meio de redes, expande a capacidade de mensuração da plasticidade foliar.

Neste trabalho, utilizou-se teoria de grafos para obtenção de informação relevante sobre a geometria de distribuição de estômatos. Imagens de plantas pertencentes a 6 espécies diferentes: *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia minima*, *Callisia repens*, *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea* foram utilizadas como molde para a modelagem. Todas estas plantas foram escolhidas por apresentarem folha com epiderme abaxial roxa, o que gerou contraste em imagens capaz de tornar os estômatos completamente visíveis.

A modelagem do metabolismo basal de plantas por meio de redes complexas também foi realizada neste trabalho. O metabolismo é talvez a melhor rede de interações já caracterizadas em biologia, porque um grande número de estudos definiram vias metabólicas.⁹ Por décadas subsequentes de aplicação da enzimologia, caracterizou-se as propriedades catalíticas e regulatórias de enzimas, mais recentemente os estudos genéticos e a biologia molecular abriram avenidas no conhecimento de genes de enzimas que catalizam as reações de transformação de matéria nos seres vivos. Existe uma quantidade sem precedentes de dados descritivos e mecanísticos sobre o comportamento dos fenômenos metabólicos que podem ser analisados como redes complexas, dos quais informação relevante sobre os sistemas vivos podem ser obtidas.

As redes metabólicas de plantas estudadas neste trabalho, foram modeladas a partir das reações metabólicas de 17 plantas disponibilizadas em uma base de dados da Internet denominada PlantCyc.¹⁰ Esta base de dados contém reconstruções de vias metabólicas de plantas baseadas na sequência genética de enzimas cujas funções catalíticas no metabolismo são conhecidas.^{11, 12} Foram modeladas redes metabólicas de plantas pertencentes as seguintes espécies: *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Brassica rapa pekinensis*, *Carica papaya*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Manihot esculenta*, *Oryza sativa japonica*, *Panicum virgatum*, *Physcomitrella patens*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffii*, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera* e *Zea mays*. Informações relevantes sobre a topologia das redes e sua relação com a filogenia das plantas foram obtidas. Além disso, a visualização de reações metabólicas como redes e a observação dos seus diferentes níveis de conectividade, nos permitiu propor modelos gerais sobre a organização e evolução do metabolismo. A constatação de que a topologia de redes metabólicas traz informação natural sobre as plantas, tornou possível a proposição da hipótese de que existe um fenômeno físico relacionado a formação-decomposição de metabólitos que está sendo simulada pelo modelo. Deste modo, a topologia destas possíveis interações naturais revelou informações indiretas sobre a biologia das plantas.

De maneira geral nós pudemos propor que a modelagem de certos sistemas de plantas por meio de teoria de grafos, pode gerar informação útil sobre a biologia das plantas. Ao longo deste trabalho, o leitor encontrará os temas sobre estômatos e redes metabólicas independentemente. Introduziremos o tema redes complexas e subdividiremos as suas

aplicações tanto no metabolismo quanto na morfometria em imagens de folhas. Começaremos abordando as redes geométricas de estômatos, mostrando as técnicas envolvidas na construção das redes estomáticas a partir de imagens de microscopia óptica. Mostraremos como experimentos de alteração no meio ambiente das plantas podem ser conduzidos a fim de que tenham interpretação através de grafos obtidos a partir de imagens microscópicas de folhas. Abordaremos, a seguir, as técnicas empregadas na análise de redes metabólicas e os resultados que mostram como é possível se obter padrões a partir de medidas intrínsecas destas redes. Provaremos que estas medidas estão relacionadas a biologia das plantas. Finalizaremos mostrando como ferramentas de percolação dinâmica em redes complexas são capazes de gerar informação sobre a topologia, organização hierárquica e evolução do metabolismo de plantas.

1.1 Revisão bibliográfica

Medidas de alterações da distribuição de estômatos sobre epidermes de folhas de plantas podem ser quantificações indiretas de plasticidade fenotípica. A plasticidade fenotípica é a habilidade que um ser vivo tem para ajustar a sua fisiologia e morfologia de acordo com as variações nas condições ambientais.¹³ Sabe-se que os estômatos são células fundamentais nas respostas de adaptação das plantas ao meio ambiente. O fato de os estômatos se encontrarem sobre epidermes de folhas, faz com que o estudo de imagens da epiderme tragam respostas sobre a própria camada de estômatos. Muitos trabalhos tem usado análise computacional em imagens de epiderme e extraído padrões diversos que permitem classificar plantas, mesmo quando expostas a diferentes condições ambientais.¹⁴ Entretanto, estes trabalhos não objetivam a obtenção de medidas diretas da geometria de distribuição de estômatos e nem quantificam a plasticidade fenotípica. Apenas recentemente alguns trabalhos tem usado descritores de redes para quantificação do padrão de estômatos sobre a epiderme, estas medidas tem sido usadas como ferramenta de quantificação das alterações na camada de células estomáticas geradas por mudanças no meio ambiente de crescimento das plantas.⁸ Estudos sobre reconhecimento de padrões utilizando descritores de redes complexas aplicados a análise de formas de folhas tem sido utilizados como ferramentas de classificação de plantas, embora estes estudos também não contemplem análises de plasticidade fenotípica e nem avaliem folhas ao nível celular.¹⁵

A possibilidade de alterações fisiológicas em plantas serem medidas por análise de imagens de folhas, traz novas perspectivas para a aplicação de ferramentas de processamento de imagens em biotecnologia e agricultura. Por exemplo, alguns trabalhos tem aplicado a análise de cores e textura de imagens na avaliação de estados nutricionais de cevada, relacionados com a adubação nitrogenada. Estes métodos podem ser utilizados na tomada de decisões acerca da adubação em larga escala a ser empregada em grandes plantações.¹⁶ Portanto, novas ferramentas capazes de acessar a plasticidade fenotípica em

folhas podem ter aplicação na avaliação das condições sanitárias e estado nutricional de plantações. Novas estratégias que acessem diretamente como camadas de células variam o seu padrão de acordo com condições ambientais ou nutricionais a que as plantas estão expostas são, portanto, alternativas para se gerar informações úteis sobre fatores como uso de adubação, regimes de irrigação e uso de pesticidas na agricultura.

Muitos estudos interdisciplinares estão provendo novas visões sobre como os estômatos evoluem e estão aptos a processar informações de sinais ambientais simultâneos, muitas vezes conflitantes e algumas vezes sob enormes variações temporais.⁵ Embora seja muito prematuro dizer se estes avanços recentes resultarão em mudanças no nosso paradigma sobre como as plantas respondem às alterações ambientais e ao mesmo tempo as gerem, é evidente que os estômatos são ferramentas chave na investigação destes fenômenos. Assim, algumas discussões científicas tem aprofundado a convergência de áreas interdisciplinares que vão desde a botânica até teoria de redes complexas, para se entender como os estômatos afetam o clima e respondem as alterações climáticas através de fenômenos que vão desde a escala molecular até a celular.¹⁷

Sabe-se que da precipitação anual de $110 \times 10^3 \text{ km}^3$, que corresponde a 110×10^{15} kg de água, 70×10^{15} kg passam por evapotranspiração em estômatos.¹⁸ A contribuição apenas da transpiração para o ciclo global da água pode ser determinada usando-se um modelo de vegetação dinâmico¹⁹; as maiores taxas de transpiração ocorrem nas florestas uniformes, quentes e úmidas dos trópicos com 32×10^{15} kg/ano de vapor de água passando através de estômatos. A fotossíntese em plantas terrestres fixa anualmente 440×10^{12} kg de CO_2 da atmosfera.²⁰ Ambos os fluxos, tanto de água quanto de CO_2 , se paralelizam já que ocorrem através do mesmo fenômeno, trocas gasosas através de estômatos e difusão de água pela folha. Desta forma, ferramentas que venham a medir precisamente padrões de distribuição de estômatos em folhas, poderão ser sensores do estado hídrico de uma floresta ou mesmo contribuir para previsão do regime hídrico ou como as plantas estão respondendo as alterações climáticas geradas pelo homem. Assim, as ferramentas de quantificação da distribuição de padrões de estômatos propostas neste trabalho, poderão ser peça fundamental no enorme edifício interdisciplinar que é entender as respostas das plantas a um meio ambiente em contínua transformação.

A ciência que desvenda os mecanismos moleculares responsáveis pela mudança da plasticidade estomática na folha é ainda incipiente, mas é evidente que os mecanismos celulares são gerados por uma teia de conexões moleculares e logicamente estes fenômenos estão conectados. Desta forma, a observação de alterações nas redes celulares poderão, no futuro, ser explicadas pelas mudanças em redes de fenômenos moleculares. Assim, a estratégia empregada neste trabalho, para modelar as redes metabólicas, poderão ser semelhantes as que se empregarão na modelagem dos eventos moleculares responsáveis pela plasticidade estomática.

Sabe-se que a abertura dos estômatos requer um controle coordenado de múltiplos processos celulares que são interconectados. Assim, podem existir fenômenos distintos e simultâneos que são responsáveis pela abertura. Além disto, a constante retro-alimentação entre os fenômenos indica que a arquitetura global dos processos é reticulada e pode ser interpretada como uma rede. A presença de diferentes vias de transdução de sinal celular que coordenam a abertura do estômato²¹, praticamente anula a possibilidade de existirem vias isoladas que geram a culminância da abertura. Alguns experimentos em que componentes individuais de algumas vias são retirados, mostram que a resposta de abertura do estômato não é alterada. Por exemplo os receptores de luz azul em *Arabidopsis*, PHOT1 e PHOT2, são ambos responsáveis pela abertura do estômato induzida pela luz, contudo a deleção ou mutação de apenas um dos genes dos receptores preserva o mecanismo de abertura.²² Portanto, a robustez e tolerância a erros dos mecanismos responsáveis pela abertura e fechamento de estômatos torna possível supor que as redes de fenômenos sejam do tipo livre escala.¹⁷ Uma conexão factual entre os sistemas estudados neste trabalho surge a partir daqui, pois a estrutura metabólica dos seres vivos tem sido modelada e quantificada como redes livre escala.²³ Uma característica típica do metabolismo é a presença de metabólitos, nodos das redes, que participam de uma grande parte do universo de reações metabólicas. Esta forma de organização mostra que a topologia destas redes integra as vias metabólicas tornando-as tolerantes a erros como mutações em enzimas por exemplo.

Redes metabólicas de plantas tem sido modeladas em escala genômica e, de maneira geral, elas tem sido caracterizadas como redes livre escala^{24, 25}. Embora certas características globais se conservem em redes metabólicas, é possível que diferenças ou padrões próprios de cada uma as diferenciem e seja possível classificar ou caracterizar plantas baseado na composição e estrutura de suas redes metabólicas. Desta forma, alguns trabalhos tem mostrado que a comparação do conteúdo das redes reflete a filogenia das espécies estudadas.²⁵ Isto sugere que a evolução do metabolismo de plantas seguiu um padrão de descendência com modificação, em que grupos mais proximamente relacionados de espécies dividem conjuntos de reações metabólicas mais similares. Portanto, comparações de redes metabólicas modeladas em escala genômica podem oferecer ferramentas preditivas na descoberta das propriedades metabólicas em diferentes grupos de plantas.

Nós procuramos neste trabalho, obter padrões específicos a partir de medidas em redes metabólicas de plantas. As redes puderam ser caracterizadas por meio de certas propriedades intrínsecas. A classificação química dos metabólitos das redes e a investigação de quais conexões são responsáveis pelas diferenças entre elas, poderá trazer no futuro, informações sobre as propriedades metabólicas específicas que caracterizam certos grupos de plantas. Estas informações poderão revelar como a funcionalidade metabólica divergiu após importantes junções na evolução das plantas.

2 REDES COMPLEXAS

Muitos fenômenos da natureza são cadeias de eventos que se conectam temporalmente, espacialmente ou materialmente ²⁶, o que torna o estudo de redes complexas extremamente útil na quantificação e visualização dos mesmos. Os sistemas vivos, por exemplo, são passíveis de serem modelados por redes, sobretudo porque o desenvolvimento científico das últimas décadas tem provido grande quantidade de informações que tornam possíveis a sua organização e conexão. Estas informações tem permitido desenvolver bases de dados que remontam mapas de conectividade de componentes celulares e sobretudo de reações metabólicas. ²⁷ Entretanto, devido ao grande número e diversidade dos componentes envolvidos, a construção destes mapas se torna extremamente complexa e requer interpretação de como eles se conectam. Portanto, a capacidade de prover modelos que quantifiquem estas interações, tem surgido juntamente com avanços no entendimento das propriedades genéricas de redes complexas. ²⁸

Uma rede pode ser definida pela teoria de grafos, sendo representada por nodos (N) e arestas (E) em um grafo $G = (N, E)$, consistindo de dois grupos distintos N e E ; onde G é um conjunto de pares ordenados de elementos de N . Os elementos de $N = (n_1, n_2, \dots, n_N)$ são nodos, vértices ou pontos do grafo G e os elementos de $E = (e_1, e_2, \dots, e_K)$ são suas arestas.

As redes eram entendidas de acordo com a teoria clássica de redes randômicas introduzida por Erdős e Rényi ²⁹, o seu modelo assumia que a distribuição de probabilidade ($p(k)$) para a conectividade (k) dos seus nodos é gaussiana, com $P(k) \approx e^{-k}$ para $k \gg \langle k \rangle$. O modelo para uma rede randômica está mostrado na Figura 1-A.

Entretanto, estudos empíricos da topologia da rede mundial de computadores e das redes sociais tem reportado estruturas diferentes daquelas das redes randômicas. Estas novas topologias encontradas, mostram que estes sistemas apresentam poucos nodos centralizadores que são muito conectados, estes nodos são conhecidos por hubs e estas redes são denominadas de redes livre escala. A ilustração geral de sua organização está mostrada na Figura 1-B. Para estas redes, verifica-se que a distribuição de probabilidades de grau ($P(k)$) ou conectividade segue uma lei de potência em que $P(k) \approx k^{-\gamma}$ e γ é denominado de expoente da lei de potência. ³⁰

Figura 1 – A) Modelo de rede randômica. B) Modelo de rede livre escala, os hubs são mostrados como pontos verdes

Fonte: Elaborada pelo autor

Sabe-se através do estudo de redes livre escala que elas mostram propriedades como flexibilidade e robustez na manutenção da topologia, o que as torna idealmente aptas para discriminar e processar múltiplos sinais simultaneamente. Estas propriedades advêm das características das redes como um todo e não dos seus componentes individuais.³¹ Desta forma a remoção aleatória de nodos de redes livre escala, tende a não alterar muito a sua topologia geral, já que é pouco provável a remoção de hubs em relação a quaisquer outros nodos menos conectados.

Análises de redes complexas tem sido empregadas em sistemas celulares e moleculares dos seres vivos, afim de se investigar modelos que podem trazer respostas sobre o funcionamento e evolução globais destes sistemas complexos.³² O metabolismo, um dos sistemas biológicos mais conhecidos da ciência, pode ser modelado como uma rede. Os estudos das propriedades estatísticas e topológicas destas redes tem mostrado que elas são do tipo livre escala.²³ Uma característica típica do metabolismo é a presença de metabólitos, nodos das redes, que participam de uma grande parte do universo de reações metabólicas, sendo, portanto, nodos muito conectados. Esta forma de organização mostra que a topologia destas redes integra as vias metabólicas tornando-as tolerantes a erros como mutações em enzimas por exemplo.

Existem várias estratégias para se modelar redes metabólicas.³³ O modelo utilizado neste trabalho, por exemplo, é uma simplificação para projeção de reações metabólicas como grafos dirigidos. A modelagem dos grafos se baseia na direção das reações metabólicas³⁴, nas quais metabólitos substratos estão ligados a metabólitos produtos de reações. A Figura 2 mostra um exemplo ilustrativo da modelagem de uma rede baseada em duas

Figura 2 – A) Reações metabólicas. B) Grafo mostrando a conexão dos metabólitos baseado na direção das reações. C) Matriz de adjacência resultante das conexões mostradas em B.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

reações metabólicas. Esta rede é representada por um grafo dirigido $G(N, E)$, em que N representa o conjunto de metabólitos ligados entre si por um conjunto de arestas E . A ligação dos nodos considera o sentido das reações, este é determinado por setas (esquerda $\Rightarrow$, direita $\Leftarrow$ e bidirecional $\Leftrightarrow$), quando as setas são bidirecionais, duas arestas são consideradas separadamente (entradas e saídas). A rede metabólica é representada por uma matriz de adjacência (A) contendo $N \times N$ elementos, em que cada elemento a_{ij} pode se conectar aos demais elementos através de uma aresta (e_i), neste caso este elemento a_{ij} da matriz recebe o valor 1, caso contrario ele recebe o valor 0.

Extraír informação topológica de uma rede complexa pode ser fundamental para o entendimento do sistema estudado. Por isto, muitos esforços tem sido empregados na elaboração de ferramentas capazes de descrever a cartografia das redes.³⁶ Interessantemente tem-se descoberto a partir da investigação de redes metabólicas, que elas apresentam estrutura modular. A classificação química dos componentes contidos nos módulos tem sugerido que grupos com funcionalidade química semelhante tem localização predominante nos mesmos módulos.^{36, 37} Este fato é interessante, porque explica que a especialização do metabolismo ocorre pela adição de novos componentes a reações químicas que envolvem os componentes prévios. Portanto a medida que novas reações vão surgindo, ocorre a especialização do metabolismo, contudo esta especialização possivelmente não é aleatória, ela segue a um padrão que gera a modularização dos componentes metabólicos. Uma pergunta vital para a biologia seria descobrir qual é o padrão desta especialização.

A teoria de seleção natural é indicativa da modularidade em seres vivos, já que de acordo com ela a origem de uma nova máquina viva requer a adaptação a partir de uma máquina previa, da qual novos componentes poderão ser adicionados ou mesmo substituídos. Desta forma, a modularização da estrutura molecular pode trazer simplificação durante a especialização. Mas o que são exatamente módulos topológicos em redes?

Podemos generalizar o conceito de módulo em uma rede como um conjunto de nodos que se conectam mais entre si do que com qualquer outro elemento da rede.³⁶ Módulos podem ser formados tanto em redes do tipo randômicas, quanto livre escala. Os desenhos na Figura 3 mostram alguns modelos simplificados de redes do tipo livre escala sem organização modular (Figura 3-A), redes randômicas com organização modular (Figura 3-B) e redes livre escala com organização modular (Figura 3-C).

Figura 3 – A) Rede livre escala sem organização modular, os nodos muito conectados coloridos de azul são os hubs. B) Rede randômica com estrutura modular e sem centralização. C) Rede livre escala com organização modular, os hubs destas redes estão localizados nos módulos triangulares mais internos e conectam-se praticamente a todos os módulos da rede, eles estão coloridos em verde nos módulos parcialmente centrais e em azul no módulo do cerne mais central da rede .

Fonte: Adaptada de RASVAZ et al.³⁷

Pode-se observar claramente na rede livre escala modular mostrada na Figura 3-C, que ela contém um cerne centralizador com nodos coloridos em azul claro. Embora não se possa generalizar qualquer topologia de uma rede livre escala modular como sendo igual a da Figura 3-C, torna-se lógico supor que redes modulares com nodos densamente conectados, apresentem cernes centralizadores. É lógico pensar nesta estrutura modular para redes metabólicas em termos evolutivos, já que a evolução do metabolismo provavelmente ocorreu a partir da adição de novos metabólitos aos pré existentes, o que chamamos de especialização do metabolismo.²⁵ Pode-se supor, então, que nos seres vivos primitivos exis-

tiam elementos pertencentes ao cerne metabólico que foram recebendo arestas (ligação a novos metabólitos) de maneira modular.

Existem ferramentas no estudo de redes complexas que são capazes de encontrar o cerne ou cerne das redes. Um destes algoritmos realiza a decomposição das redes em camadas de conectividade crescente denominadas k -cores.³⁸ Este tipo de decomposição ajuda no entendimento da topologia e organização da distribuição dos metabólitos ao longo das redes. Nós aplicamos este algoritmo nas redes metabólicas de plantas estudadas neste trabalho. A percolação de uma rede pelo algoritmo de k -cores divide os seus nodos dentro de sub-estruturas de camadas hierarquicamente ordenadas. A camada k -core mais central é obtida pela remoção recursiva de todos os nodos com grau menor do que k , até que os elementos remanescentes tenham grau maior ou igual a k .³⁸ A Figura 4 mostra o processo de percolação topológica onde as camadas k -core vão sendo formadas em uma rede metabólica teórica, um nodo n nesta rede tem um índice de camada k se ele pertence ao k -core mas não ao $(k + 1)$ -core. O valor máximo de k em uma dada camada k_i é chamado k_{max} .

Figura 4 – A) Decomposição em camadas k -core de uma rede metabólica teórica. Primeira iteração: Os nodos periféricos com grau $k_i = 1$ (cinza claro) são removidos. Segunda iteração: A rede remanescente da primeira iteração é excisada novamente e resta um cerne dividido em 2 módulos completamente conectados

Fonte: Elaborada pelo autor.

Alguns trabalhos tem aplicado o algoritmo de k -cores na decomposição de redes de interação proteína-proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, os resultados obtidos com estas investigações tem revelado que os cerne centrais destas redes contêm uma maior proporção de proteínas essenciais (produtos de genes letais), que são altamente conservadas evolutivamente em relação a outras proteínas.³⁹ Estas proteínas fazem parte de complexos proteicos conservados evolutivamente.³⁹ De maneira análoga, a descoberta de um possível cerne metabólico central e conservado poderá revelar como os fluxos de matéria nos seres vivos estão organizados em torno de moléculas centralizadoras.

2.1 Redes e padrões de estômatos

Estômatos se distribuem aos milhares sobre camadas de células da epiderme foliar formando, na maioria das plantas, uma rede densamente povoada destas células. A função desta camada repleta com estas válvulas celulares é a troca gasosa entre a planta e o meio ambiente.⁴⁰ Estas válvulas são finamente reguladas, de modo que se abrem ou se fecham de acordo com processos celulares que respondem as condições do meio ambiente como umidade, presença ou ausência de luz, nível de CO_2 etc.

A densidade populacional destas células sobre a folha é também elemento de controle da planta e de suas respostas a um meio ambiente que é altamente variável.^{41, 7} Esta capacidade de adaptação é denominada de plasticidade estomática ou plasticidade fenotípica de estômatos. Por exemplo, se o meio ambiente está seco, a tendência é que a densidade de estômatos diminua para que se evite a perda excessiva de água pela planta; se o nível de CO_2 no meio ambiente é alto, a tendência é que a densidade diminua já que rapidamente se atinge o limiar de CO_2 requerido para a realização plena da fotossíntese pela planta.⁶

A modelagem da rede de estômatos desenvolvida para este trabalho, contempla um modelo de grafos que se baseia na distância entre os estômatos. Logicamente, se o número de células sobre uma certa camada diminui, então existe uma tendência geral de que a distância média entre estas células aumente e vice versa. Entretanto, este problema geométrico de distribuição de estômatos sobre folhas ainda não tem sido extensivamente investigado; não se sabe exatamente como estas distâncias variam, por isso a disponibilidade de ferramentas matemáticas que possam modelar a distribuição de estômatos em folhas, podem trazer respostas sobre como as plantas adaptam a geometria de distribuição destas células às alterações físicas e químicas do meio.

Nós supomos inicialmente que cada estômato em uma imagem microscópica de uma folha poderia ser considerado um ponto em um grafo, então nós estabelecemos certas condições para a conexão destes pontos que se baseavam na distância entre eles. A construção de uma rede de estômatos a partir de imagens microscópicas está ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – A) Rede de conexões teóricas entre estômatos. B) Imagem de microscopia óptica da epiderme abaxial da folha da planta *Ctenante oppenheimiana* magnificada 200×; estômatos verdes distribuídos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Detalhes da estratégia utilizada na modelagem da rede de estômatos ainda serão abordados neste trabalho.

3 EXPERIMENTOS E RESULTADOS COM ESTÔMATOS

3.1 Experimentos

As folhas das plantas das espécies *Ctenante openheimiana*, *Callisia repens*, *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia pallida*, *Oxalis atropurpurea* e *Tradescantia minima*, foram utilizadas nos experimentos de microscopia. Estas plantas não foram escolhidas arbitrariamente; a sua escolha se baseou na coloração da superfície abaxial de suas folhas, que variava entre vários tons de púrpura; as imagens microscópicas nos revelaram um contraste interessante entre a cor da epiderme e a cor dos estômatos, que sempre se mostravam esverdeados. Sabe-se que este contraste de cor tem consequências na forma de captação da luz pelas plantas para realização da fotossíntese e está completamente associado a fenômenos fisiológicos relacionados a captação de luz, reflexão do calor e transpiração.⁴²

Embora não seja o objetivo deste trabalho a análise das consequências da coloração de folhas na fisiologia e ecologia das plantas, o contraste gerado entre as cores roxa e verde, nos possibilitou a visualização plena dos estômatos, que em uma folha completamente verde, não são completamente visíveis à microscopia óptica. O contraste entre a cor dos estômatos e o restante da epiderme pode ser claramente visto na imagem da planta *Ctenante openheimiana* mostrada na figura 5-B da seção anterior.

Estão disponibilizadas as imagens microscópicas de folhas em várias magnificações para todas as espécies de plantas estudadas neste trabalho. Além destas espécies, imagens de outros 7 tipos de plantas de cor púrpura, todas encontradas no campus da USP-São Carlos, estão disponibilizadas nos endereços da internet:

<<https://drive.google.com/drive/folders/0B4DFZhPeg6sDTnNWdEZWZGNQX00?usp=sharing>>

<<https://drive.google.com/drive/folders/0B1QPPBFJ9wIBSGIRODJLMV8tSGs?usp=sharing>>

3.1.1 Condições de crescimento e aclimação de plantas

As plantas das espécies *Ctenante Openheimiana* e *Callisia repens* tiveram alterações significativas na densidade estomática associadas a variação em condições ambientais, por isto estas condições de aclimação estarão descritas aqui. Embora nós também tenhamos realizado experimentos com aclimação nas espécies *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia pallida*, *Oxalis atropurpurea* e *Tradescantia minima*, o número de indivíduos estudados e de imagens coletadas não permitiram associar a plasticidade observada com as alterações ambientais.

3.1.1.1 *Ctenante Openheimiana*

Plantas em estágio inicial de desenvolvimento (brotos com até 10 cm de altura), foram adaptadas com umidade relativa contínua de 55%, densidade de fluxo de fótons (PFD) de $150\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times s$ e fotoperíodos de 4 e 24 horas por dia, durante 60 dias em uma câmara de crescimento controlado Eletrolab EL212/4G-RS. A temperatura para o fotoperíodo claro foi de 25°C e para o período escuro de 20°C . O substrato utilizado para o crescimento e enraizamento da planta foi o Carolina Soil do Brasil. O regime de hidratação da planta foi de 50ml/dia com H_2O aplicados individualmente. Grupos de nove plantas foram crescidas com fotoperíodos de 4 e 24 horas por dia, que são as duas condições ambientais que foram adaptadas para as plantas desta espécie.

3.1.1.2 *Callisia repens*

Broto de plantas *Callisia repens* com aproximadamente 3 cm de comprimento foram plantados sob 2 litros do substrato de crescimento de plantas Genebom do Brasil, em frascos de polietileno transparentes de 6 l de volume, vazados com buracos de 1 mm^2 na base. Os frascos foram deixados no meio ambiente sob ação de fotoperíodos solares e oscilações de temperatura do ambiente, em uma área $0,15\text{ m}^2$ por frasco, por um período de 30 dias durante o mês de julho do ano de 2015 no local georeferenciado em -22.007 (S) ; -47.894 (W).

Os frascos contendo as plantas foram divididos em 2 grupos experimentais contendo 20 indivíduos: O primeiro grupo foi lacrado e teve a umidade relativa e temperaturas no seu interior monitoradas continuamente por meio do sensor de umidade e temperatura DHT11. A Umidade foi mantida sob variação de 85 a 90 % no interior dos frascos lacrados no topo e perfurados na base. O segundo grupo cresceu dentro de frascos abertos durante o fotoperíodo. A umidade e temperatura também foram monitorados dentro dos frascos abertos e variaram entre 40 e 70 % e entre 20 e 35°C respectivamente. Os frascos lacrados eram abertos apenas uma vez ao dia, durante um período de 1 minuto, para permitir troca de gases adicional. Ambos os grupos recebiam 50 ml de H_2O por dia.

3.1.2 Microscopia e Morfometria de estômatos

3.1.2.1 Microscopia

Cortes de folhas vivas tiveram a superfície abaxial visualizada através de microscopia óptica. Folhas das plantas *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia minima*, *Callisia repens*, *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea* foram montadas em lâminas, cobertas com água e recobertas com lamínulas. Cortes de $0,5\text{ cm}^2$ do terço medial de folhas das plantas *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina* e *Ctenante oppenheimiana*, foram hidratados e submetidos a microscopia óptica após período máximo de 60 minutos pós excisão. Folhas inteiras das plantas *Tradescantia minima*, *Callisia repens*

e lobos separados do trevo *Oxalis atropurpurea* foram utilizados na microscopia. As folhas sofriam excisão das plantas e eram montadas diretamente em lâminas com a superfície abaxial voltada para cima, cobertas com água destilada e recobertas com lamínula.

Os microscópios utilizados foram o Axio-Lab A1 da Zeiss e o estereo microscópio Zeiss discovery V20 acoplados com as câmeras axiocam ERc5s e Icc1 sob a gestão do software Axiovision da Zeiss. As magnificações utilizadas variaram entre as plantas. Desta forma para *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia minima* e *Callisia repens* foram usados os aumentos 15× no estereo microscópio e 50×, 100×, 200× e 400× no microscópio Axio-Lab A1. Para as plantas *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea* utilizou-se as magnificações de 50×, 100×, 200× e 400× obtidas com as objetivas do microscópio Axio-Lab A1.

3.1.2.2 Morfometria

3.1.2.2.1 Cálculo de frequência e áreas estomáticas em imagens

Imagens da superfície abaxial das plantas magnificadas 15× para as espécies *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina* e *Callisia repens* e 50× e 100× para as espécies *Ctenanthe oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea*, foram processadas com o programa Gnu image manipulation (Gimp). Cada estômato foi marcado manualmente com pontos que cobriam o seu centro geométrico. O Molde de pontos marcados foi submetido a um algoritmo implementado em linguagem Matlab, contendo instruções para contagem dos pontos e determinação dos seus centros geométricos (veja Figura 6).

A frequência estomática foi obtida pela equação a seguir, em que f é a frequência de estômatos por área de folha, N é o número de estômatos na imagem e I é a área da imagem em mm^2 .

$$f = \frac{N}{I} \quad (3.1)$$

As áreas dos estômatos foram calculadas utilizando-se a ferramenta de medida do gimp e medindo-se o comprimento e a largura dos estômatos através do comprimento do eixo central da célula estomática tomado como eixo de abertura horizontal dos ostíolos e do eixo vertical central da célula, tomado como largura do estômato. As magnificações utilizadas no microscópio variavam de acordo com a espécie, já que a área dos estômatos de cada espécie é também variável. Utilizou-se imagens com aumentos de 50× para a espécie *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina* e *Callisia repens* e aumentos 100× e 200× para as espécies *Tradescantia minima*, *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea*. O valor médio da área de estômatos por imagem foi calculado conforme equação a seguir:

$$\langle \bar{St} \rangle = \sum_{i=1}^n \frac{St_i}{N} \quad (3.2)$$

em que St_i é a área do i -ésimo estômato da imagem, $\langle \bar{St} \rangle$ é a área média dos estômatos de uma dada imagem e N é o número de estômatos na imagem

3.1.2.2.2 Medida de distâncias entre estômatos

As imagens de microscopia óptica são processadas para que se obtenha um molde de pontos das células estomáticas da imagem. Subsequentemente é feita a determinação das coordenadas cartesianas do centro geométrico de cada ponto. Um algoritmo implementado em linguagem Matlab-2012a determina apenas um píxel central para cada estômato da imagem. A Figura 6 ilustra a construção de um molde de pontos a partir de uma imagem da folha da planta *Ctenante oppenheimiana*. O centro geométrico de cada ponto é determinado por um algoritmo implementado em Matlab-2012a do qual se obtêm as coordenadas cartesianas do píxel centroide (x_i, y_j) de cada ponto.

3.2 Modelagem de grafos a partir de estômatos

Nós supomos inicialmente que cada estômato em uma imagem microscópica de uma folha poderia ser considerado um ponto em um grafo, então estabeleceu-se certas condições para a conexão destes pontos que se baseavam na distância entre eles. Os pontos foram determinados a partir da identificação manual dos estômatos em uma imagem microscópica bidimensional. A Figura 6 ilustra a construção de um molde de pontos obtidos por meio de uma imagem da folha da planta *Ctenante oppenheimiana* magnificada $50\times$.

Figura 6 – A) Imagem da superfície abaxial da folha da planta *Ctenante oppenheimiana*.
B) Molde de pontos dos estômatos visualizados em A).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O centro geométrico de cada ponto, como os mostrados nas imagens da Figura 6, é determinado por um algoritmo do qual se obtêm as coordenadas cartesianas do píxel centróide (x, y) de cada ponto. A distância entre cada par de pontos da imagem é dada pela equação a seguir, em que d é a medida da distância entre dois centroides (i, j) dos estômatos.

$$d(i, j) = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2} \quad (3.3)$$

Uma matriz de distâncias entre estômatos de uma imagem genérica é definida conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – A) Ilustração de 5 estômatos (verdes) conectados uns aos outros por arestas. B) Matriz de distâncias de cada par de estômatos, onde $d(i,j)$ é a distância entre os estômatos desenhados na figura ao lado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um grafo pode ser modelado a partir de cada estômato segmentado de uma imagem microscópica, onde um dado centróide de um estômato genérico (x, y) representa um nodo no grafo. O critério para se estabelecer arestas entre estes nodos é baseado na distância entre pares de estômatos, desta forma um raio de conectividade (r) determina se dois estômatos se tornam conectados de acordo com a distância. O tamanho deste raio de conexão controla a conectividade da rede; a medida que r aumenta, mais conexões deverão ser estabelecidas e a densidade da rede deverá ser maior. Portanto várias redes poderão ser construídas de acordo com o critério de conectividade, o que permite analisar muitas redes independentes associadas a uma única imagem.

A rede estomática é definida por uma matriz de adjacências A , que recebe valores de 0 ou 1 se as distâncias $d(i, j)$ entre um par de estômatos está dentro de um dado intervalo de raios de conectividades r , como se segue:

$$A(i, j) = 1, \text{ se } d(i, j) \leq r$$

$$0, \text{ se a condição anterior for falsa}$$

A construção de uma rede de estômatos a partir de imagens microscópicas está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Modelo de uma rede estomática. A) Estômatos delimitados por uma circunferência com raio de conectividade de $r = 100 \mu m$. Arestas são estabelecidas entre estômatos se os valores de distância entre os pares forem menores ou iguais a $100\mu m$. Cada estômato colorido está no centro de uma circunferência de mesma cor. B) Matriz de adjacências correspondente a imagem ilustrada ao lado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.1 Medidas em redes de estômatos

Medidas de parâmetros de rede podem ser obtidas a partir da matriz de adjacências $A(i, j)$, cujos elementos representam os estômatos de uma imagem microscópica. O número de estômatos por imagem é representado pelo número de nodos (N); o número de arestas (E) se refere a todos os possíveis estômatos presentes dentro de raios de conexão (r) de cada um dos estômatos de uma dada imagem. O grau ou conectividade k_i de um dado estômato n_i é definido como o número de vizinhos que n_i possui:

$$k_i = \sum_{j=1}^N A_{ij}. \quad (3.4)$$

A conectividade é também usualmente medida em termos globais como:

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N A_{ij}. \quad (3.5)$$

em que $\langle k \rangle$ é o grau médio para todos os estômatos da rede em uma dada imagem microscópica.

A distribuição de probabilidade de grau $P(k)$ para uma dada rede é definida pela fração de nodos com determinado grau k ; Se existem N nodos totais em uma rede e $n(k)$ deles tem grau k , a probabilidade para a distribuição do grau é dada pela seguinte equação:

$$P(k) = \frac{n(k)}{N}. \quad (3.6)$$

e a entropia de grau (S) para a rede poderá ser definida pela equação a seguir:

$$S = - \sum_{k=1}^N p(k) \log p(k). \quad (3.7)$$

3.3 Resultados

Estômatos distribuídos sobre a epiderme abaxial de folhas são o nosso objeto de estudo. Por isto, iniciaremos abordando resultados relativos a microscopia e alguns aspectos da morfometria destas células entre as espécies estudadas, subsequentemente abordaremos os resultados referentes a plasticidade dos parâmetros morfométricos gerada por alterações nas condições ambientais. Por último, mostraremos como as métricas de redes podem ser usadas nas quantificações da morfometria dos estômatos e também da alteração da plasticidade destas células.

3.3.1 Morfometria

As imagens de microscopia óptica obtidas das plantas *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina*, *Callisia repens*, *Tradescantia minima*, *Ctenanthe oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea* mostram células estomáticas em folhas vivas e sem processamento histológico. Uma imagem para cada espécie estudada está mostrada na Figura 9.

Figura 9 – As imagens de microscopia óptica mostram estômatos verdes sob superfície abaxial de folhas. A) Imagem de *Tradescantia pallida* em aumento 50× B) Imagem de *Tradescantia zebrina* em aumento 50× C) Imagem de *Callisia repens* em aumento 50× D) Imagem de *Tradescantia minima* aumentada 100×. E) Imagem de *Ctenanthe oppenheimiana*, magnificação de 200×. F) Imagem de *Oxalis atropurpurea* em aumento 200×.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de magnificação microscópica utilizados na coleta das imagens da Figura 9, dão a dimensão da diferença entre o tamanho dos estômatos nas espécies estudadas. Por exemplo, o comprimento do estômato de *Tradescantia pallida*, o maior entre todas

as plantas estudadas, é da ordem de mais de 10 vezes o comprimento do estômato da planta *Oxalis atropurpurea*, o menor. Todas as plantas foram escolhidas por terem a cor do pavimento da superfície abaxial contrastante com a cor dos estômatos; as folhas tinham face abaxial púrpura e estômatos verdes na maioria dos casos. Entretanto, a cor da face abaxial apresentou plasticidade sobretudo nas espécies *Oxalis atropurpurea* e *Tradescantia minima* em que elas variavam de verde a púrpura de acordo com variações ambientais. A alteração de cor em *Oxalis atropurpurea* será detalhada na seção A.1, contida no apêndice deste trabalho.

Observa-se que dependendo da espécie e condição ambiental, o tamanho dos estômatos pode variar de 10 a 100 μm de comprimento e ocorrer em densidades variando entre 5 e 1000 estômatos por mm^2 .⁴³ Apesar desta grande variabilidade, existe uma tendência geral na relação entre densidade estomática e tamanho do estômato para diferentes plantas, geralmente plantas com alta densidade estomática apresentam estômatos pequenos e vice versa. Muitos trabalhos tem reportado a relação inversa entre densidade de estômatos na folha e a área da célula estomática.¹⁷ Encontramos a mesma relação para as 6 espécies estudadas. O gráfico mostrado na Figura 10 quantifica as medidas.

Figura 10 – O Gráfico da função da densidade média de estômatos (eixo das ordenadas) em relação a área estomática média (eixo das abcissas). A planta *T. pallida* é a que possui maior área de estômato e menor densidade média. Espécies indicadas por seu nome em cada ponto do gráfico. Equação do gráfico mostra o decaimento geométrico das densidades estomáticas em relação ao aumento da área média dos estômatos. As barras de erros mostram os desvios padrão das medidas calculadas a partir de $n = 18$ imagens de 6 plantas por espécie.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A observação das imagens de epiderme gera a inferência espacial de que as distâncias médias entre estômatos variam em relação às suas densidades na folha. Estes dados estarão evidenciados através de medidas de distâncias entre estômatos em diversas imagens de cada uma das espécies estudadas. O fato de as distâncias entre estômatos vizinhos serem parâmetros utilizados como critério para a construção de grafos neste trabalho, implica na mensuração da variação das distâncias em função das densidades estomáticas. As medidas de distância quantificam como a plasticidade da folha pode ser mensurada a partir da distribuição destas células na epiderme. As medidas das distâncias médias entre estômatos vizinhos em relação às densidades estomáticas podem ser evidenciadas nos gráficos da Figura 11, que mostram a dispersão dos valores de densidade em função da distância média entre os estômatos para as seis espécies estudadas.

Os resultados mostrados na Figura 11 indicam que as médias das distâncias entre estômatos vizinhos são inversamente proporcionais às suas densidades estomáticas e va-

Figura 11 – A) Dispersão dos valores de distância média entre estômatos vizinhos em função da densidade estomática para cada uma das 6 plantas estudadas neste trabalho: A) *T. pallida*. B) *Tradescantia zebrina*. C) *Callisia repens*. D) *T. minima* E) *Ctenanthe oppenheimiana*. F) *Oxalis atropurpurea*. Cada ponto no gráfico representa uma medida para cada imagem.

Fonte: Elaborada pelo autor.

riam linearmente com as mesmas em cada espécie independentemente. Estas medidas são, portanto, evidências diretas da plasticidade no que se refere a variação de distribuição dos estômatos sobre a epiderme de folhas. Ao se transpor os valores médios das medidas

indicadas nos gráficos mostrados anteriormente para um unico gráfico que quantifica a relação *distância* $\times$ *densidade* em todas as espécies estudadas aqui, observou-se uma tendência de decaimento geométrico das distâncias entre estômatos com relação a densidade estomática. O gráfico que mostra esta tendência está indicado na Figura 12.

Figura 12 – A) Dispersão dos valores de distância média em função da densidade estomática média para as plantas *T. pallida*, *Tradescantia zebrina*, *Callisia repens*, *T. minima*, *Ctenanthe oppenheimiana*, *Oxalis atropurpurea*. As barras de erro indicam o desvio padrão das medidas em relação aos valores médios das distâncias entre estômatos e densidades estomáticas por espécie. (N = 5 plantas por espécie, 3 imagens por planta).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se inferir do gráfico da Figura 12, que a distância entre estômatos decai geometricamente com o aumento da densidade estomática entre espécies, uma tendência similar aquela mostrada para a relação densidade $\times$ área da célula estomática vista anteriormente na Figura 10. Esta tendência provavelmente se mantém em qualquer conjunto de plantas de diferentes espécies com diferenças significativas nas densidades estomáticas médias.

Mostraremos, a seguir, que a plasticidade da distribuição de estômatos na folha pode existir como uma consequência direta de variações ambientais.

3.3.2 Plasticidade morfométrica dos estômatos induzida por mudança ambiental

Algumas alterações ambientais nas condições de crescimento de grupos de plantas foram induzidas afim de se observar medidas da alteração na densidade estomática e distância entre estômatos vizinhos. A relação entre distâncias e frequência estomática pode ser ilustrada na Figura 13, onde duas imagens de plantas *Ctenanthe oppenheimiana* crescidas em diferentes condições de iluminação por luz fluorescente, apresentam diferentes frequências estomáticas e consequentemente diferentes valores nas distâncias entre estômatos vizinhos.

Figura 13 – A) Imagem da planta *Ctenanthe oppenheimiana* crescida sob 24 horas de iluminação diária com estômato genérico no centro de uma circunferência em amarelo de raio igual a $200\mu m$ que varre uma área onde se encontram 20 estômatos vizinhos mais próximos do estômato central, a densidade de estômatos na imagem é de $150\ estômatos/mm^2$. B) Imagem da planta crescida sob 4 horas de iluminação diária com estômato genérico no centro de uma circunferência de raio igual a $264\ \mu m$, a densidade é de $82\ estômatos/mm^2$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As imagens mostradas na Figura 13, ilustram a relação inversa entre densidade e distâncias entre estômatos. Observe que o raio abrangido para a vizinhança dos 20 estômatos mais próximos do estômato central da imagem, é maior quando a frequência de estômatos é menor, isto é, a imagem da planta que foi submetida a 4 horas de iluminação diária por luz fluorescente apresenta uma densidade menor e distâncias entre estômatos vizinhos maiores em relação a planta exposta a fotoperíodos de 24 horas diários. O patamar da diferença entre as distâncias dos estômatos vizinhos nas duas condições ambientais extremas de iluminação é uma evidência da plasticidade foliar na adaptação ambiental. É importante observar que a imagem da Figura 13 tem apenas caráter ilustrativo. A obtenção de dados quantitativos da reprodutibilidade do efeito observado foi feita para grupos de plantas expostas a 4 e 24 horas diárias de fotoperíodo. Os valores observados para a dispersão da variação das densidades estomáticas em função das distâncias médias dos estômatos vizinhos está mostrado no gráfico da Figura 14.

Figura 14 – Correlação entre densidade e distância média dos estômatos vizinhos da superfície abaxial de folhas de *Ctenanthe oppenheimiana* adaptadas a fotoperíodos diários de 24 horas (quadrados) e 4 horas (triângulos). As barras de erro indicam o desvio padrão da medida para N= 18 plantas, 3 folhas por planta e 5 imagens por folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico da Figura 14 mostra que existe um intervalo na dispersão que não apresenta pontos. Isto ocorre em densidades estomáticas variando aproximadamente entre 115 e 155 estômatos/mm². Este fato sugere que condições intermediárias de aclimação do

fotoperíodo para valores entre 24 e 4 horas por dia, poderiam preencher este intervalo.

Grupos de plantas da espécie *Callisia repens* submetidas a diferentes condições de umidade aplicados em regime contínuo, também apresentaram grandes alterações em sua densidade estomática. A Figura 15 ilustra estas alterações.

Figura 15 – Imagens em aumento 50× da folha da planta *Callisia repens* condicionada em ambiente com umidade atmosférica oscilante ou sob umidade relativa controlada continuamente em 90%. a) Imagem microscópica de planta exposta a umidade atmosférica oscilante com densidade estomática de 15,312 *estômatos/mm²*, estômato genérico no centro da circunferência de raio igual a 643µM que varre a área coberta pelos 20 estômatos mais próximos. b) Imagem microscópica de planta condicionada em 90% de umidade relativa, densidade estomática de 46,788 *estômatos/mm²*, estômato genérico no centro de uma circunferência de raio igual a 440 µm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 – Dados de densidade estomática de plantas *Callisia repens* expostas a 90% de umidade e a condições atmosféricas para os meses de junho e julho de 2015. Dados baseados em 21 imagens coletadas de 7 indivíduos por grupo experimental.

Condição ambiental	$\langle f \rangle$
umidade 90%	46 (± 2)
atmosfera	19,3 (± 3)

Fonte: Elaborada pelo autor.

As imagens mostradas na Figura 15 ilustram densidades estomáticas significativamente maiores na planta submetida a alta umidade em relação a imagem da planta crescida sob variação atmosférica da umidade. Este efeito é reprodutível em um grupo maior de indivíduos. O conjunto de dados para as referidas diferenças estão resumidos na tabela 1, que apresenta os valores médios de frequência estomática $\langle f \rangle$ nas dadas condições.

Trabalhos prévios tem mostrado que a densidade estomática aumenta sob elevadas umidades⁴¹ e também sob aumento do fluxo de fótons sobre a folha.⁷

3.4 Redes de estômatos

A Figura 16 ilustra um molde de pontos obtidos a partir da imagem de uma folha da planta *Callisia repens*. Cada ponto do molde é considerado um nodo em um grafo como já mencionamos anteriormente. Imagens de folhas da planta *Callisia repens* como a mostrada na Figura 16, varrem áreas que variam entre 45 e 70% da área total da folha da planta (dados não mostrados). Portanto são imagens muito representativas do que ocorre com a folha inteira; pode-se estimar que uma imagem equivale a uma folha.

Figura 16 – A) Imagem microscópica da superfície abaxial da folha da planta *Callisia repens* magnificada $15,6 \times$ com estômatos verdes visíveis na superfície. B) Molde de pontos da imagem A, cada ponto indica o centro de cada estômato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo usado para definir a conexão de estômatos em um grafo estabelece limites de distância para conexão (raios de conexão) (veja Figura 8). Nós ilustraremos, a seguir, através dos histogramas de grau obtidos a partir de redes geradas com a imagem da planta *Callisia repens* mostrada na Figura 16, como varia a distribuição das conexões nos grafos em função dos raios de conexão. Os histogramas de grau da Figura 17, ilustram como a conectividade (grau dos nodos) se distribue nas redes estomáticas criadas com 6 raios de conexão diferentes, com intervalos constantes entre eles de $1000 \mu m$. Estes intervalos mostram a variação de conectividades a partir das quais as redes foram modeladas.

Figura 17 – Histogramas de grau obtidos a partir de grafos criados com a imagem da Figura 16. Os histogramas mostram a variação dos raio de conexão, com incrementos subsequentes de $1000 \mu m$, letras (A-F); Raios de conectividade: A- $100 \mu m$, B- $1100 \mu m$, C- $2100 \mu m$, D- $3100 \mu m$, E- $4100 \mu m$, F- $5100 \mu m$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar dos histogramas mostrados na Figura 17, que o aumento dos raios de conexão gera um largo espectro de conectividade possível para as redes formadas com a imagem da planta *Callisia repens*. Este espectro pode cobrir desde valores mínimos para o raio conexão, em que a maior proporção dos nodos tem valores de grau muito baixos, até

valores máximos de conexão, em que o raio empregado é suficiente para adicionar todos os estômatos da imagem como vizinhos em um grafo. Neste último caso, a rede apresenta todos os estômatos da imagem conectados aos demais (conexão máxima possível); como a rede apresenta 688 estômatos, então o grau de cada estômato de uma rede modelada com o raios de conexão maiores do que $r = 6500\mu m$, para a imagem mostrada na Figura 16, é de 688; isto está ilustrado na Figura 17. Portanto, a grande vantagem da modelagem de grafos em variados limiares de conectividade, é que ela permite a visualização da medida de distância entre estômatos por meio de um espectro de conectividades, isto gera uma grande quantidade de dados de quantificação. Algumas medidas de funções da distribuição de grau para um amplo espectro de variação do parâmetro de conectividade r foram calculadas. A variação do grau médio $\langle k \rangle$ em função do raio de conexão e também a variação das entropias de grau ($S(k)$), estão mostrados no gráfico da Figura 18.

Figura 18 – Gráfico da função de distribuição do grau médio ($\langle k \rangle$) e das entropias de grau (S) em relação aos raios de conectividade (r). Os raios variam em um intervalo de 500 μm entre eles. Cada ponto nos gráficos se refere a uma rede obtida de acordo com um raio de conexão; os gráficos mostram 16 redes obtidas a partir de 16 raios de conexão. A) Função dos raios de conectividade variando com o $\langle k \rangle$ para 16 redes. B) Função dos raios de conectividade variando com as entropias de grau nas 16 redes. As redes são obtidas a partir de uma única imagem microscópica mostrada na Figura 16.

Fonte: Elaborada pelo autor

O gráfico da função de distribuição do grau médio e das entropias de grau em relação aos raios de conectividade mostrados na Figura 18, quantificam as redes obtidas. O grau médio varia em uma função sigmoideal com os raios, logo os patamares sob os quais a conectividade pode ser variada estão definidos nos gráficos. A Entropia de grau varia da mesma maneira que a função de entropia varia para uma dada distribuição de probabilidade genérica⁴⁴, isto é, o raio de conectividade varia com a entropia em uma função parabólica cujo valor máximo se refere a uma rede que apresenta a maior proporção dos nodos com valores de grau próximos ao grau médio da rede. Se observarmos nos histogramas da Figura 17, veremos que o raio de conexão que maximiza a entropia de grau está entre 3000 e 4000 μm , neste limiar de conexão uma grande proporção dos estômatos têm valores de grau muito próximos ao grau médio da rede. Esta é uma distribuição gaussiana clássica para as redes complexas randômicas como proposto por Erdős & Rényi.²⁹ Observa-se também que o meio da curva sigmoideal do gráfico de distribuição do grau médio, representa uma rede gerada pelo mesmo raio de conexão que aquele que maximiza a entropia. Portanto as medidas de entropia e grau médio são ferramentas que podem ser usadas na caracterização de redes de estômatos baseadas na geometria de distribuição das células.

A distribuição de entropia e grau médio para uma imagem de cada uma das plantas estudadas, foi calculada a fim de se ter uma ilustração quantitativa da variação destes parâmetros nas várias escalas de medidas de microscopia. Nós efetuamos as medidas a partir de redes construídas com imagens magnificadas 15,6 $\times$ para plantas *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina* e *Callisia repens*, *Tradescantia minima* e 50 $\times$ para as espécies *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea*. Estes valores de aumento microscópico foram usados para otimizar a relação entre número de estômatos por imagem e a visibilidade destas células nas imagens obtidas. Ao mesmo tempo as medidas em imagens obtidas em variadas magnificações, traz informação sobre a variação dos parâmetros de redes para plantas diferentes em escalas diferentes de distância. Os resultados estão mostrados nos gráficos da Figura 19

Figura 19 – Gráfico da função de distribuição das entropias de grau (S) e do grau médio ($\langle k \rangle$) em função dos raios de conectividade (r) para redes modeladas a partir de uma imagem de cada uma das plantas: *Tradescantia pallida*, *Tradescantia zebrina* e *Callisia repens*, *Tradescantia minima*, *Ctenante oppenheimiana* e *Oxalis atropurpurea*. A) Distribuição da entropia em função dos raios de conexão para as plantas indicadas na legenda de acordo com a cor e símbolo do seu gráfico específico. B) Distribuição do grau médio $\langle k \rangle$ em função dos raios de conexão para as mesmas plantas com gráficos respectivos aos da legenda indicada na imagem A).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A primeira evidência mostrada no gráfico da Figura 19 é a de que as medidas dos parâmetros de rede se distribuem, em função de raios de conectividade, de acordo com uma escala que varia de 1 a 8000 μm , entre todas as plantas estudadas. O fato de os raios de conectividade serem arbitrários e poderem variar de acordo com as escalas métricas, das próprias imagens coletadas, sob as várias magnificações, faz com que as distribuições dos parâmetros de rede calculados também variem proporcionalmente dentro das escalas. Entretanto, os valores dos raios de conexão deverão ser ajustados para as suas escalas específicas a fim de que se permita uma distribuição completa das conectividades entre 0 e o número máximo de estômatos em uma dada imagem. A distribuição dos valores de $\langle k \rangle$ em função dos raios de conexão, mostrada na Figura 19-B, traz a falsa impressão de que plantas com alta densidade estomática, estômatos pequenos e distância entre estômatos pequenas, como é o caso de *Oxalis atropurpurea* e *Ctenante oppenheimiana* (veja Figura 12, 11, 10), tenham medidas de grau pequenos, embora as densidades estomáticas sejam elevadas. Isto ocorre simplesmente devido a um efeito de escala de magnificação de microscopia utilizada, o que está relacionado ao efeito da variação do tamanho dos estômatos entre as espécies estudadas. Pode-se observar que enquanto a distância média entre estômatos vizinhos mais próximos de *Oxalis atropurpurea* é da ordem de 100 μm , em *Tradescantia pallida* ela é da ordem de 700 μm (veja Figura 12), ou seja, quase $7 \times$ maior, entretanto, a diferença na magnificação usada na microscopia é de apenas $2,5 \times$. Este artefato de técnica ocorre porque é impossível observar estômatos de *Oxalis atropurpurea*, por exemplo, em magnificações menores do que $50 \times$, porque o seu estômato é muito pequeno e as densidades estomáticas por imagem, nesta magnificação, são muito pequenas. Portanto, o número de estômatos da planta *Oxalis atropurpurea* em imagens magnificadas $50 \times$ é bem menor do que o número de estômatos por imagem de *Tradescantia pallida* magnificadas $15,6 \times$. Este fato leva a observação das distribuições do grau médio com magnitudes inferiores para plantas das espécies *Oxalis atropurpurea* e *Ctenante oppenheimiana*, em comparação com as demais plantas, como mostrado no gráfico da Figura 19-B.

A visualização de conectividades em grafos obtidos a partir de imagens de folhas da planta *Ctenante oppenheimiana* submetidas a diferentes fotoperíodos (4 e 24 horas de iluminação diários), mostrados na Figura 20, permitem plena visualização do que ocorre com as arestas de uma rede ao se aumentar gradativamente os raios de conexão.

Figura 20 – Imagens microscópicas de folhas da planta *Ctenanthe oppenheimiana* exposta a 4 e 24 horas de fotoperíodo, colunas esquerda e direita respectivamente. O raio de conexão inicial de $r = 80\mu\text{m}$ é incrementado por $20\mu\text{m}$ até $r = 160\mu\text{m}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 – Dispersão dos valores médios do grau médio $\langle\langle k \rangle\rangle$ em função de 10 raios de conexão obtidos de grafos baseados em imagens de epiderme de plantas submetidas 4 horas (quadrado cinza), and 24 horas de fotoperíodo diários (triângulo preto), as barras de erro mostram o desvio padrão dos graus médios obtidos de cada rede entre 9 plantas diferentes ($N = 3$ imagens por planta).

Fonte: Elaborada pelo autor

Pode ser observado nos grafos mostrados na Figura 20, que o aumento dos raios de conectividade (r) gera grafos progressivamente mais conectados em imagens onde a densidade estomatosa é maior. O número de arestas adicionadas nas redes obtidas a partir de imagens de epiderme de plantas expostas a 24 horas de iluminação diária é proporcionalmente maior do que em plantas expostas a 4 horas.

Aplicou-se a percolação em um número maior de imagens e plantas por grupo experimental, os resultados estão mostrados no gráfico a seguir (Figura 21). O gráfico mostra a relação entre os valores médios do grau médio $\langle\langle k \rangle\rangle$ e os raios de conexão, aplicados em uma percolação com variação de $20\mu\text{m}$, para valores de r variando entre 80 e $260\mu\text{m}$, feitas em 9 plantas por grupo experimental.

O gráfico da Figura 21 mostra que a dispersão de $\langle\langle k \rangle\rangle$ em relação a r é linear, as equações das retas tem diferentes coeficientes angulares para grafos obtidos a partir de imagens de plantas mantidas a 4 e 24 horas de fotoperíodo diários. Estes resultados derivam das diferenças de distâncias entre estômatos vizinhos como já mostramos aqui (Figura 14) e são apenas uma consequência indireta das diferenças geradas pela variação

nas densidades estomáticas.

Os resultados obtidos com medidas em grafos construídos a partir de estômatos, permite concluir que é possível discernir plasticidade fenotípica em plantas com base em grafos, entretanto a acurácia destas medidas e a sua capacidade de discernimento em grupos de plasticidade distintos, gerados por condições ambientais específicas, ainda requerem mais estudos e experimentos com maior número de indivíduos.

É possível que características que são imensuráveis a partir de simples medidas de distância entre estômatos ou densidades estomáticas, possam ser quantificadas por uma varredura precisa nos valores dos parâmetros de rede obtidos em uma percolação geométrica com diferentes raios de conectividade. Logo, mesmo que os grafos gerados derivem de distâncias entre estômatos, a variação das redes estomáticas que podem ser formadas é muito grande e pode ser arbitrada. A modelagem de grafos baseada em distância entre pontos é, por conseguinte, uma ferramenta de reconhecimento de padrões muito poderosa, já que parâmetros de conectividade arbitrários podem ser iterados.

4 REDES METABÓLICAS

4.1 Proposta e motivação

A disponibilidade de informações sobre sistemas biológicos geradas por meio de dados provenientes do sequenciamento completo de genomas, tem possibilitado o desenvolvimento de bases de dados que contêm uma enorme quantidade de componentes moleculares e de reações metabólicas. Existem bases de dados que contêm reconstruções de vias bioquímicas baseadas na sequência de genes de enzimas com funções metabólicas conhecidas.^{34, 12, 45, 46, 11, 10} Entretanto, devido ao enorme número e diversidade de componentes moleculares disponibilizados por estas bases de dados, torna-se extremamente complexo montar mapas de conectividade e modelos sobre a interação destes componentes. Devido a este fato, apenas uma visão limitada sobre estrutura organizacional dos componentes moleculares contidos nos sistemas biológicos tem sido atingida. Entretanto, tem-se conseguido interpretar a conectividade destes sistemas por meio do entendimento das propriedades genéricas de redes complexas.²⁸ Desta forma, o metabolismo dos seres vivos tem sido modelado e quantificado, em larga escala, por meio de redes complexas.²³ A nossa proposta é a de modelar e quantificar as reações metabólicas de plantas disponibilizadas em bases de dados públicas como o PlantCyc¹⁰, através de um modelo que torne possível a conexão de metabólitos de reações bioquímicas. Os conjuntos destas conexões formam as redes complexas do metabolismo das plantas.

4.2 Metodologia

4.2.1 Base de dados

As redes metabólicas das 17 plantas estudadas foram construídas a partir de uma base de dados pública de reações metabólicas de plantas conhecida por Plantcyc.¹⁰ Esta base disponibiliza listas de reações metabólicas para plantas específicas que já tiveram o seu genoma sequenciado. No momento em que as redes metabólicas deste trabalho foram modeladas, a base continha 17 plantas. A tabela 2 disponibilizada no anexo A1, mostra os endereços na internet para a lista de reações das respectivas plantas.

Algumas etapas de pre-processamento textual foram aplicadas nas listas de reações disponibilizadas pela base de dados: i) Conversão para codificação de texto do tipo UTF-8; ii) As reações químicas duplicadas foram removidas; iii) Os coeficientes estequiométricos das equações químicas foram removidos já que eles não foram contemplados em nosso modelo de rede metabólica.

4.2.2 Modelo para construção das redes metabólicas

Construiu-se uma rede metabólica para cada planta a partir da sequência de reações metabólicas disponibilizadas na base de dados PlantCyc.¹⁰ As redes são representadas por grafos dirigidos $G(N, E)$ em que N são os nodos, metabólitos das reações, ligados uns aos outros por uma aresta (E). Cada metabólito encontrado nas reações foi ligado a outros considerando-se a seta de direção das reações, seta esquerda para direita $\Rightarrow$, direita para esquerda, $\Leftarrow$ e seta bidirecional $\Leftrightarrow$. Desta forma, se um metabólito se encontra a esquerda de outro em uma reação com seta apontada para direita, conta-se uma adjacência de saída do metabólito da esquerda com entrada no metabólito da direita, no caso da seta bidirecional, conta-se entrada e saída em ambos metabólitos. É importante observar que o par de metabólitos específicos conectados por uma dada aresta é único na rede; se houver repetição desta ligação em diferentes reações, o par conectado não é considerado novamente. A rede metabólica é representada por uma matriz de adjacência de $N \times N$ linhas e colunas. A Figura 22 ilustra o modelo adotado para a construção da rede metabólica a partir de um par de reações e a matriz de adjacência correspondente a esta rede.

Figura 22 – A) Reações metabólicas. B) Grafo mostrando a conexão dos metabólitos baseado na direção das reações. C) Matriz de adjacência resultante das conexões mostradas em B.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

4.2.3 Medidas de topologia global

Uma rede metabólica é representada por uma matriz de adjacências A de $N \times N$ elementos em que cada elemento a_{ij} pode estar relacionado a outro por uma ligação ou aresta, neste caso este elemento recebe número 1, caso contrário ele recebe 0. O grau de um nodo k_i , também denominado de conectividade, representa o número total de arestas de entrada e de saída, com $k_i^{entrada}$ e k_i^{saida} , representando os graus de entrada e saída dados respectivamente por

$$k_i = k_i^{entrada} + k_i^{saida} = \sum_{j=1}^N a_{ij} + \sum_{j=1}^N a_{ji} \quad (4.1)$$

desta forma o graus médios de entrada e saída na rede $\langle k \rangle$ são dados por:

$$\langle k_{entrada} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N A_{ij}. \quad (4.2)$$

e

$$\langle k_{saida} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N A_{ji}. \quad (4.3)$$

O caminho mais curto entre dois metabólitos (nodos) é dado por $D(v_i, v_j)$, que assume zero quando é impossível de se chegar a v_j a partir de v_i . O caminho médio de vias $\langle L \rangle$ de uma dada rede é calculado através da detecção da via mais curta entre todos os pares de nodos, e computação da média destes caminhos em toda a rede:

$$\langle L \rangle = \sum_{i \neq j} \frac{D(v_i, v_j)}{N(N-1)} \quad (4.4)$$

A distribuição de probabilidade $P(k)$ dos graus de entrada e saída de uma rede, é assumido como a probabilidade de se ter um dado nodo com $k^{entrada}$ e k^{saida} graus. As redes conhecidas como livre escala, seguem uma relação de potência, o que significa que a distribuição das probabilidades de se ter um dado nodo com grau k , é $P(k) = k^{-\gamma}$ onde $\gamma_{entrada}$ ou γ_{saida} são os expoentes de entrada e saída da lei de potência.

4.3 Resultados

4.3.1 Redes metabólicas

As redes metabólicas de plantas foram modeladas com base em reações metabólicas encontradas na base de dados PlantCyc¹⁰ (Veja tabela 2). Estas redes foram compiladas em formato gephy (.gml)⁴⁷ e estão disponibilizadas na internet no endereço <<https://drive.google.com/drive/folders/0B1QPPBFJ9wIBWlpMbk90dU1Bd2s?usp=sharing>>.

4.3.2 Tamanho das redes

O tamanho das redes metabólicas foi quantificado em termos do número de reações e de metabólitos, a menor e maior redes continham 2433 e 3546 metabólitos e 2208 e 3442 reações respectivamente, correspondendo a rede das plantas *C. reinhardtii* e *A. thaliana col.* O número de metabólitos e reações comuns entre todas as plantas estudadas é de 1880 e 1165 respectivamente, que correspondem a 64.3% e 43.1% em relação ao número médio de metabólitos (2921) e de reações (2701) de todas as plantas estudadas.

A tabela 3 mostrada no material anexo A2, indica o número de metabólitos e reações com seus valores médios para cada grande classe das plantas estudadas, estes valores são as medidas indiretas do tamanho das redes. Nós analisamos a relação entre número médio de reações e o número médio de metabólitos, dentro de cada grande classe de plantas estudadas. O gráfico da Figura 23 mostra a dispersão do número médio de metabólitos ($\langle N \rangle$) em relação ao número médio de reações ($\langle R \rangle$), dentro das principais classes de plantas estudadas.

Figura 23 – Número médio de reações ($\langle R \rangle$) em função do número médio de metabólitos ($\langle N \rangle$) por cada classe de planta. As classes de plantas *Dicotiledôneas*, *Monocotiledôneas*, *Licófitas*, *Briófitas* e *Clorófitas* estão listadas de acordo com o seu número médio de reações e de metabólitos.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

O gráfico mostrado na Figura 23, sugere que as reações metabólicas tem sido acumuladas ao longo da evolução das plantas, como já demonstrado em trabalhos prévios.²⁵ Embora estes trabalhos sugerem que o tamanho das redes metabólicas tenha correlação evidente com a divergência evolucionária no reino plantae, o mesmo não ocorre com relação ao tamanho dos genomas nucleares. Por exemplo o tamanho do genoma nuclear de *A. thaliana* é de aproximadamente 124 megabases (Mb), enquanto que o de *P. patens* têm em torno de 480 Mb com respectivamente 25.498 e 35.938 genes respectivamente.^{48, 49} Entretanto o número de reações metabólicas é de 3.424 e 2651 respectivamente. Consequentemente podemos afirmar que o número de genes por planta não está correlacionado com o tamanho das redes metabólicas.

4.3.3 Topologia global das redes

Alguns parâmetros topológicos globais de redes metabólicas foram medidos em todas as plantas estudadas, afim de se caracterizar a topologia e estatística da conectividade destas redes. Os expoentes da lei de potência ($\gamma_{entrada}$ e $\gamma_{saída}$), o comprimento médio de vias por rede ($\langle L \rangle$) e o grau médio ($\langle k \rangle$) foram calculados. Estes dados estão descritos na Tabela 4 disponível no anexo A3. Os valores dos expoentes da lei de potência (γ) indicam que todas as redes metabólicas das plantas estudadas aqui são do tipo livre escala, assim como redes metabólicas de seres vivos de maneira geral o são. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios que caracterizaram redes metabólicas de seres vivos quanto a suas propriedades estatísticas e topológicas²³ (Veja Figura 1). Nós mostramos no gráfico da Figura 24 como os parâmetros topológicos globais médios variam dentro de cada classe de plantas estudada e em função do número médio de reações metabólicas por classe.

Figura 24 – Número médio de reações por classe de plantas em função de valores médios de três medidas topológicas: Grau médio $\langle k \rangle$ (triângulo preto), comprimento médio das vias $\langle L \rangle$ (quadrado azul) e expoente da lei de potência ($\gamma_{entrada}$) (círculo vermelho).

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

O gráfico da Figura 24, mostra que o comprimento médio de vias ($\langle L \rangle$), o grau médio $\langle k \rangle$ e os valores dos expoentes da lei de potência não variaram entre as classes de plantas. Estes resultados mostram que as redes metabólicas são robustas na manutenção de sua topologia, mesmo sob grandes variações no seu tamanho.²³ Por exemplo, a rede do organismo menos complexo estudado aqui, a alga unicelular *C. reinhardtii*, que representa a classe das Clorófitas, tem um valor de grau médio quase igual ao encontrado para as dicotiledôneas, as plantas mais complexas. Portanto estes resultados indicam que as plantas conservam a topologia global de suas redes metabólicas e o modelo de redes complexas utilizado aqui, quantifica a robustez e conservação da topologia. A medida que o metabolismo de determinada planta se torna mais complexo, as conexões vão proporcionalmente aumentando para cada nodo destas redes, o que conserva o valor do diâmetro nestas redes de maneira geral. Portanto, o aumento na complexidade metabólica dos organismos ocorre com ganhos na conectividade de metabólitos individuais. Nós observamos o mesmo para as plantas estudadas aqui, isto pode ser observado no gráfico da Figura 24, através das medidas de $\langle L \rangle$. Estes resultados também foram obtidos por Jeong e colaboradores²³ em seu trabalho pioneiro sobre organização em larga escala de redes metabólicas nos seres vivos.

5 PADRÕES EM REDES METABÓLICAS

5.1 Proposta e motivação

O estudo de medidas em redes complexas tem revelado métricas topológicas específicas que caracterizam sua conectividade⁵⁰, os valores destas medidas podem ser consequência dos processos dinâmicos responsáveis pela formação das redes. Baseado nestes estudos, pode-se formular a hipótese de que redes metabólicas de plantas contêm padrões capazes de caracteriza-las. Para investigar esta hipótese, utilizou-se a estratégia de tomar medidas topológicas locais de cada nodo das redes como conjuntos de características que formam um vetor ou assinatura de características específicos de cada planta. Esta estratégia está amparada no fato de alguns trabalhos recentes mostrarem que é possível estabelecer filogenias a partir de topologias de redes metabólicas.⁵¹ Embora análises de comparações de sequências de DNA sejam uma ferramenta muito eficiente para se estabelecer filogenias, o conteúdo de sinal filogenético em redes metabólicas pode trazer informação complementar que pode ser útil na resolução de ramificações que não são bem resolvidas pela análise de DNA, além disso a verificação de que existe sinal filogenético nas redes, mostra que a sua modelagem reflete a biologia dos indivíduos, este é um passo fundamental, pois mostra que estas redes podem conter outros tipos de informação sobre a biologia dos indivíduos.

5.2 Metodologia

5.2.1 Classificação taxonômica das plantas contidas na base de dados

A árvore filogenética das 17 plantas estudadas foi montada de acordo com bases de dados taxonômicos públicas.⁵² Esta classificação reflete todas as mudanças feitas na taxonomia de reino Viridiplantae contendo dois sub-reinos: Chlorobionta e Estreptobionta, representando uma visão de relações moleculares e morfológicas entre os maiores taxa das plantas verdes: clorobionta (CH), estreptobionta (ST), embriófitas (plantas terrestres) (EM), plantas vasculares (VP), plantas com sementes (SP), Angiospermas (AG).² A base de dados PlantCyc, consiste apenas de plantas verdes, destas sua maior parte são plantas terrestres. Das plantas escolhidas para análise deste trabalho, apenas a alga clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii* é aquática. Entre as plantas terrestres sua maior parte são plantas vasculares, apenas a briófito *Physcomitrella patens* não possui vasos condutores de seiva. Entre as plantas vasculares estudadas a sua grande maioria apresenta sementes, apenas a criptogama, *Selaginella moellendorffii* não apresenta. As angiospermas estudadas estão divididas em dois grupos principais, monocotiledôneas e dicotiledôneas. A árvore filogenética mostrada na Figura 25, agrupa as plantas estudadas em seus respectivos ramos

taxonômicos.

Figura 25 – A árvore filogenética mostra as grandes divisões taxonômicas no reino vi-ridiplantae. As 17 plantas utilizadas no estudo de redes metabólicas estão classificadas em seus principais grupos taxonômicos. Cada planta e divisão dos grupos está indicada por sua sigla respectiva. As plantas utilizadas no estudo estão colocadas em 5 grandes grupos: Clorobiontes (CH), Estreptobiontes (ST), Embriófitas (EM), Plantas vasculares (VP), plantas com sementes (SP), Angiospermas (AG), as angiospermas são divididas em monocotiledôneas e dicotiledôneas. As plantas são: *Arabidopsis thaliana* (AT), *Brachypodium distachyon* (BD), *Brassica rapa pekinensis* (BRP), *Chlamydomonas reinhardtii* (CR), *Carica papaya* (CP), *Glycine max* (GM), *Hordeum vulgare* (HV), *Manihot esculenta* (ME), *Oryza sativa japonica* (OSJ); *Panicum virgatum* (PV), *Physcomitrella patens* (PP), *Populus trichocarpa* (PT), *Selaginella moellendorffii* (SM), *Sorghum bicolor* (SB), *Setaria italica* (SI), *Vitis vinifera* (VV), *Zea mays* (ZM).

Fonte: Adaptada de PALMER et. al.²

5.2.2 Reconstrução filogenética baseada em 78 genes de cloroplasto.

A reconstrução filogenética de plantas, baseada em métodos que reconhecidamente geram dados filogenéticos precisos como a análise de sequências de DNA de genes de cloroplasto⁵³, foi realizada neste trabalho, afim de que os resultados do método proposto, baseado em medidas de topologia local de redes metabólicas, pudessem ser comparados com um resultado experimental confiável e já bem estabelecido na literatura, que agrupasse as 17 plantas estudadas.⁵³

Uma matriz contendo sequências primárias de 78 genes de cloroplasto de 360 taxa, foi reduzida para se gerar um alinhamento de 15 taxa que coincidiam com o conjunto de 360 taxa disponíveis que haviam sido avaliados em um estudo prévio de análise filogenética, baseada em genes de cloroplasto.⁵³ Os dois taxa que não estavam contidos neste conjunto inicial *B. rapa pekinensis* e *S. italica*, tiveram os seus genomas de cloroplasto carregados na base de dados genbank⁵⁴ e as sequências dos 78 genes avaliados foram alinhadas com as dos demais 15 taxa, através do algoritmo MAFFT.⁵⁵ Este alinhamento foi sujeito a reconstrução filogenética utilizando análise de probabilidade máxima, através do programa IQTREE.⁵⁶ A análise de probabilidade máxima, gerou uma árvore filogenética que foi avaliada quanto a sua confiança estatística, por meio de 1000 etapas de bootstraps. As árvores filogenéticas resultantes concordaram umas com as outras e classificaram as plantas, do nosso estudo, de maneira idêntica a que Rufehl e colaboradores⁵³ encontraram, caso se avaliasse apenas os 17 taxa do nosso estudo. Os dados do alinhamento dos 76 genes de plastídeo das 17 plantas e as árvores filogenéticas estão compartilhadas no endereço <<https://drive.google.com/drive/folders/1nfqvZ4EWFyqhzzUKM38sdkpNAXE4CoDt?usp=sharing>>

5.2.3 Medidas topológicas locais

Uma rede metabólica é representada por uma matriz de adjacências A de $N \times N$ elementos, em que cada elemento $a(i, j)$ pode estar relacionado a outro por uma ligação ou aresta, neste caso este elemento recebe número 1, caso contrário ele recebe 0. O grau de um nodo k_i , também denominado de conectividade, representa o número total de arestas de entrada e de saída, com $k_i^{entrada}$ e k_i^{saida} representando os graus de entrada e saída:

$$k_i = k_i^{entrada} + k_i^{saida} = \sum_{j=1}^N a(i, j) + \sum_{j=1}^N a(j, i) \quad (5.1)$$

O coeficiente de agrupamento local c_i , de um dado nodo n_i em um grafo é calculado por

$$c_i = \frac{e_n}{k_i(k_i - 1)} \quad (5.2)$$

onde e_n é o número total de arestas ou conexões abrangidos por todos os vizinhos v_i de um dado nodo n_i , ligado a k_i outros nodos.

Hub-scores são medidas topológicas locais de uma rede que atribuem valores ou notas aos nodos muito conectados(hubs), de acordo com a sua vizinhança. Os vizinhos dos nodos muito conectados de uma rede são denominados de authorities. Um algoritmo denominado de algoritmo de HITS, atribui pontuações aos hubs $h(v_i)$ (hub-scores) e aos authorities $a(v_i)$ (authoritie-scores) e as computa de acordo com o grau do nodo k_i se ligados como authorities aos hubs ou vice versa. Este algoritmo assume a condição inicial $h(v_i) = a(v_i) = 1$ e partir disto atribui as pontuações (scores) de acordo com as equações a seguir:

$$a(v_j) = \sum_{a_{ij}=1} h(v_i) \quad (5.3)$$

e

$$h(v_i) = \sum_{a_{ij}=1} a(v_j) \quad (5.4)$$

A diversificação metabólica é fundamental na evolução das plantas, porque ela permite que se estabeleçam novas interações entre as plantas e o meio ambiente. Alguns estudos que comparam o conteúdo das redes metabólicas de plantas, tem mostrado que ele reflete a filogenia, isto é, grupos de plantas evolucionariamente mais próximos, dividem uma maior proporção de metabólitos comuns.²⁵ Consequentemente é possível que exista informação funcional, hierárquica e mesmo filogenética, que pode ser retirada de medidas em redes metabólicas

5.2.4 Extração de características e filogenia

Um conjunto de nodos comuns entre as 17 redes metabólicas, contendo 1880 elementos, foi escolhido para a realização das medidas em cada planta. Cada elemento deste conjunto foi marcado e disposto nos vetores na sua respectiva dimensão. Para cada rede metabólica de uma planta (R_P), um vetor de características $\phi_P = [\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m]$ foi construído, em que m é o número de metabólitos comuns entre todas as plantas estudadas. A medida de co-variância dos valores das referidas métricas topológicas é calculado por um método estatístico denominado análise de componentes principais (PCA).

Admitiu-se que um par de plantas é tão similar entre si, quanto os valores de suas métricas topológicas o são. Calcula-se uma matriz de distâncias euclidianas entre pares de plantas. Para duas plantas genéricas P_i e P_j , pode-se estimar a sua distância filogenética a partir da medida de distância euclidiana entre um par de vetores, conforme equação a seguir:

$$D(P_i, P_j) = \sqrt{(P_i\mu_1 - P_j\mu_1)^2 + (P_i\mu_2 - P_j\mu_2)^2 + \dots + (P_i\mu_m - P_j\mu_m)^2} \quad (5.5)$$

Uma matriz de distâncias de 17X17 dimensões agrupa todas as combinações possíveis de medidas entre plantas. A partir desta matriz um dendograma ou árvore filogenética pode ser construído. Existem métodos que tornam possível correlacionar a matriz de distâncias encontrada com um dendograma, por meio de agrupamento hierárquico das medidas. O método de agrupamento hierárquico UPGMA^{*57} foi aplicado para gerar um dendograma. Pode-se avaliar a consistência entre os agrupamentos gerados e a matriz de distâncias, através de uma medida denominada coeficiente de correlação cofenético (CPCC),⁵⁸ este coeficiente varia entre [-1, 1], os valores próximos de 1 indicam a mais alta correlação de Pearson entre a matriz e o agrupamento gerado.

O intervalo de confiança para os ramos do dendograma gerado pode ser estimado a partir de amostragem variacional do vetor de características. Diferentes vetores de determinada dimensão, que apresentam os mesmos elementos (metabólitos) em cada ciclo de amostragem, poderão ser variados ao longo dos ciclos amostrais. Cada etapa ou "round" desta amostragem, é conhecida por bootstrap (BS). Por exemplo, se um dado vetor de 100 elementos é amostrado dentro do universo de 1880 metabólitos comuns entre as plantas, pode-se escolher estes 100 elementos com o critério de serem os mesmos em cada etapa de amostragem. Dado um conjunto de amostras do vetor de características $E = \{e\phi_f \mid e = 100, 200 \dots, 1800\}$, várias amostragens poderão ser feitas para $e = 100, e = 200 \dots, e = 1800$.

Esta estratégia traz duas vantagens importantes: i) Gera informação estatística com a qual se pode estabelecer o intervalo de confiança. ii) Mostra a correlação dos intervalos de confiança com o tamanho das amostras. A Figura 26 resume o método empregado para se obter informação filogenética à partir das redes metabólicas.

* UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)

Figura 26 – Ilustração de etapas de processamento de uma rede metabólica para obtenção de informação filogenética. As setas indicam as etapas sucessivas. A) Primeira etapa: Modelagem da rede através de reações metabólicas. Segunda etapa: Cálculo de medidas topológicas de cada metabólito e atribuição dos seus valores respectivos (números vermelhos) encontrados. Terceira etapa: Construção do vetor com os valores das medidas topológicas. B) Construção de uma matriz contendo as distâncias euclidianas entre pares de vetores de características contendo 17X17 elementos, referentes as distâncias entre plantas P_i X P_j . Quinta etapa: Agrupamento hierárquico por UPGMA, baseado na matriz de distâncias.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

5.3 Resultados

5.3.1 Topologia local e filogenia

Algumas medidas topológicas para cada nodo específico da rede, denominadas de medidas de topologia local, foram calculados. Os valores das medidas de grau (k_i), grau de entrada (k_i^{entrada}), grau de saída ($k_i^{\text{saída}}$), hub-score ($h(v_i)$) e coeficiente de agrupamento local (c_i), foram usadas independentemente na montagem de vetores de características.

O vetor de característica ϕ_P contendo as medidas, é composto de 1880 componentes comuns entre todas as redes metabólicas de plantas estudadas aqui. A Figura 27, a seguir, mostra um gráfico de dispersão do primeiro e segundo componentes, da análise do componente principal (PCA), envolvendo os vetores de características referentes as cinco métricas topológicas locais das redes metabólicas das 17 plantas estudadas.

Figura 27 – Gráfico de dispersão dos dois componentes principais obtidos com o PCA aplicado nos vetores das métricas topológicas locais A) hub-score, B) grau, C) grau de entrada, D) grau de saída e E) coeficiente de agrupamento local.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

A análise de PCA mostrada na Figura 27, quantifica dispersão das métricas topológicas de acordo com as plantas respectivas. Pode-se observar que a medida do hub-score gerou menores variâncias entre vetores características topológicas locais, em plantas de uma mesma classe (Figura 27-A). Esta medida distingue as plantas pertencentes a cada uma das 5 grandes classes taxonômicas estudadas. As medidas de grau, grau de entrada e grau de saída agrupam as plantas em 4 grandes classes que são Clorófitas, Briófitas, Licófitas e Angiospermas, entre as angiospermas estas métricas não separam as plantas pertencentes as grandes classes das Monocotiledôneas e Dicotiledôneas. A medida de coeficiente de agrupamento local não foi capaz de agrupar as plantas em suas respectivas classes.

A informação de que métricas de topologia local de redes geram sinal filogenético, sugere que relações evolucionárias entre seres vivos podem ser investigadas através de medidas de redes complexas e indica que este estudo deve ser mais detalhado a fim de que se quantifique o nível do sinal filogenético.

Hierarquia filogenética a partir de topologia local de redes metabólicas de plantas

Observa-se a partir dos dados mostrados na seção anterior, que as topologias locais das redes metabólicas acessadas pela medida hub-score, geram sinal filogenético que distingue as plantas corretamente em suas principais classes taxonômicas. A partir disso, é possível que se correlacione as medidas dos vetores de características.

Pode-se observar na Figura 28-a), o dendograma obtido a partir das distâncias euclidianas calculadas entre pares de vetores de características de plantas compostos pela medida hub-score. As ramificações filogenéticas observadas são semelhantes a filogenia já estabelecida para as plantas do presente estudo (veja Figura 25) e se assemelha a árvore filogenética baseada em genes de cloroplasto.⁵³ O suporte estatístico para análise do dendograma baseado em medidas de hub-score, foi feito a partir de árvores filogenéticas geradas pela amostragem aleatória do vetor de características. Os intervalos de confiança estão mostrados nas ramificações do dendograma da Figura 28-a), eles mostram que as principais ramificações obtidas, como as divisões entre os 4 filos principais (Clorófita, Briófitas, Licófitas e plantas vasculares), recebem altos valores de confiança estatística. Adicionalmente, analisou-se a robustez do método de acordo com o tamanho dos vetores de características ($\phi_P = \{\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m\}$) usados na geração das árvores filogenéticas. Amostrou-se os vetores contendo 100, 200, ..., 1800 metabólitos com 1000 ciclos para cada tamanho de vetor. Os resultados desta análise estão encontrados na Figura 28-b), onde curvas respectivas a cor referida nas ramificações do dendograma ao lado, mostram como variam os intervalos de confiança ao longo da amostragem de vetores. As curvas mostram que o intervalo de confiança das ramificações aumenta proporcionalmente com a amostragem de vetores de características com dimensões crescentes.

Figura 28 – (a) Dendrograma baseado na métrica topológica hub-score. O traço contendo o número 0.125 mostra a escala arbitrária do dendrograma. Os números acima de cada ramo do dendrograma, indicam o suporte estatístico usando 1000 ciclos amostrais. Os círculos coloridos em cada ramo representam a atribuição dada a variação do suporte estatístico em função do aumento na dimensão dos vetores. b) Gráfico da variação do intervalo de confiança em função do tamanho do vetor contendo métricas hub-score. Os ramos do dendrograma estão atribuídos por um ponto com a mesma cor das curvas respectivas no gráfico.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.³⁵

Observa-se do dendrograma mostrado na Figura 28, que existe discernimento filogenético entre os 4 filós de plantas estudadas neste trabalho. Interessantemente, algumas ramificações mais profundas no dendrograma podem ser atribuídas corretamente se comparadas com a classificação filogenética já estabelecida para estas plantas.⁵² Por exemplo, todas as dicotiledôneas estudadas, neste trabalho, são da classe *Rosidae*. Dentro da classe *Rosidae* existem as subclasses *Fabidae* e *Malvidae* que parecem ter atribuição correta para as plantas das espécies *P. trichocarpa*, *M. esculenta* e *G. max*, pertencentes ao grupo das *Fabidae* e para as plantas *C. papaya*, *B. rapa pekinensis* and *A. thaliana*, pertencentes ao grupo das *Malvidae*. Aparentemente, em um nível de sub-ramificação mais profundo do dendrograma, as espécies *P. trichocarpa* e *M. esculenta* foram corretamente agrupadas na sua ordem *Malpighiales* e as espécies *B. rapa pekinensis* and *A. thaliana* dentro da ordem *Brassicales*, observe que os valores de intervalo de confiança são elevados nestas ramificações. Estes resultados mostram que as medidas de topologia local em redes metabólicas tem um alto nível de sinal filogenético.

6 TOPOLOGIA DA MAQUINARIA METABÓLICA

6.1 Proposta e motivação

Um dos desafios da biologia moderna é o de encontrar a estrutura do funcionamento das máquinas biológicas, por meio de um desenho geral que mostre como se organizam os processos moleculares que compõe e tornam os seres vivos operacionais.⁵⁹ Sabe-se que estes mecanismos são dirigidos pelas leis da termodinâmica e que a sua organização deve tornar o elemento vivo capaz de funcionar dentro de uma estrutura geral.⁶⁰ Todos os seres vivos contem DNA ou RNA e uma tendência a auto montagem e auto-replicação, por exemplo.

Muitos esforços tem sido empregados para se entender como os seres vivos geram e transmitem a sua energia através de seus componentes materiais. Certamente, o entendimento do metabolismo celular, que é o conjunto de reações químicas que geram o funcionamento do sistema vivo, tem permitido um melhor entendimento da distribuição de energia através do metabolismo. O metabolismo tem sido entendido como uma rede complexa; a organização destas redes em larga escala, tem sido quantificada de modo que tem-se encontrado leis matemáticas gerais que explicam como os metabólitos se conectam e a topologia de sua conexão.^{23, 32} Juntamente com estes estudos, veio o entendimento de que as redes metabólicas tem estrutura hierárquica e modular³⁷ (veja Figura 3). Já que o metabolismo pode ser entendido como uma rede modular, então como operam e se organizam estes módulos?

A proposta de se usar a decomposição das redes metabólicas por meio de k -cores é uma estratégia para tentar responder a pergunta formulada anteriormente. Usar esta estratégia deriva do fato de que a ferramenta de decomposição por k -cores gera camadas de conectividade crescente e um cerne central que está completamente conectado em uma rede. Portanto uma boa estratégia para se observar a topologia de redes de maneira dinâmica, é através da observação do que ocorre com a sua decomposição por k -cores.³⁸ O que topologias geradas por uma simples ferramenta de percolação em redes podem revelar sobre a estrutura, função e evolução das redes metabólicas de plantas? O cerne central gerado por esta técnica está correlacionado com o cerne de distribuição de matéria nos seres vivos? Responder estas perguntas é a motivação do nosso estudo.

6.2 Metodologia

6.2.1 Decomposição de redes metabólicas em k -cores

A decomposição da rede pelo algoritmo k -cores divide os seus nodos dentro de subestruturas de camadas hierarquicamente ordenadas denominadas de k -cores. A camada

k -core mais central é obtida pela remoção recursiva de todos os nodos com grau menor do que k , até que os elementos remanescentes tenham grau maior ou igual a k .³⁸ A Figura 29 mostra o processo de percolação topológica, onde as camadas k -core vão sendo formadas em uma rede metabólica teórica formada a partir de reações metabólicas. Um nodo n nesta rede tem um índice de camada k , se ele pertence ao k -core mas não ao $(k + 1)$ -core. Uma k -camada k_i é composta por todos os nodos cujo índice de camada é k . O valor máximo de k em uma dada camada k_i é chamado k_{max} .

Figura 29 – A) Exemplo de duas reações químicas do metabolismo basal. B) Os metabólitos das reações estão conectados como substratos e produtos. Eles teoricamente se conectam a outros metabólitos que participam de outras reações metabólicas que não estão descritas. A decomposição em camadas k -core da rede metabólica teórica segue etapas sucessivas. Primeira iteração: Os nodos periféricos com grau $k_i = 1$ (cinza claro) são removidos. Segunda iteração: A rede remanescente da primeira iteração é excisada novamente e resta um cerne dividido em 2 módulos completamente conectados. B) Ilustração da decomposição da rede metabólica da planta *Arabidopsis thaliana* que sofre decomposição e excisão exaustiva de $K=1$ até $K=18$, nesta última camada, resta um cerne totalmente conectado onde é impossível a retirada de mais nodos. C) Matriz de adjacências do cerne é composta apenas pelos metabólitos que participam das reações descritas em A).

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO.⁶¹

6.2.2 Atribuição química e conectividade nos k -cores

Os metabólitos contidos nas redes metabólicas de plantas foram distribuídos ao longo das camadas k -core, aqueles pertencentes a última camada k -core foram identificados, listados e quantificados. Uma lista contendo a atribuição destes metabólitos na respectiva camada está disponibilizada no endereço <<https://drive.google.com/drive/folders/17cJesaY1uR7ewg3SsmloHVfNXojFtKC-?usp=sharing>>.

Após sua identificação e atribuição química, as conexões entre metabólitos da rede de uma dada planta e seu o cerne central foram contadas através do número de arestas que cada nodo do cerne central fazia com os metabólitos da rede. Estas conexões foram atribuídas a cinco classes de metabólitos: Aminoácidos, Nucleotídeos, Lipídeos, Carboidratos e os metabólitos do cerne central. Nós avaliamos as conectividades dentro de uma classe bioquímica específica, entre classes bioquímicas e entre os elementos de uma dada classe e aqueles contidos no cerne central da rede metabólica da planta *Arabidopsis thaliana*. Se algum metabólito de uma das referidas classes estivesse contido no k -core central, ele era retirado de sua classe e atribuído exclusivamente ao cerne central para evitar ambiguidades de atribuição. A contagem de arestas foi feita por um algoritmo implementado em linguagem matlab-2015a e a partir de scripts computacionais escritos em awk⁶², que continham instruções com listas dos elementos das referidas classes bioquímicas e do cerne central.

6.2.3 Classificação e atribuição de metabólitos nos k -cores

Os metabólitos das redes metabólicas de cada uma das 17 plantas foram classificados em algumas classes gerais:

Metabólitos comuns: Metabólitos do conjunto interseção de metabólitos entre as 17 redes metabólicas estudadas.

Metabólitos secundários: São metabólitos que reconhecidamente pertencem ao metabolismo especializado de plantas. A identificação destes metabólitos foi feita a partir da comparação de toda a lista de metabólitos de cada planta com a base de dados PlantCyc compounds¹⁰ que automaticamente classifica metabólitos secundários e por meio da ferramenta de pesquisa Pubchem⁶³, que adicionou informação não contida na base PlantCyc compounds.

Os metabólitos distribuídos ao longo das camadas k -core foram atribuídos às classes referidas acima, por meio de scripts computacionais que continham as listas dos metabólitos referentes a cada classe. As listas dos metabólitos distribuídos nas suas respectivas camadas k -cores, bem como a atribuição por classe em cada camada da rede, estão disponibilizados e compartilhados no endereço <<https://drive.google.com/drive/folders/17cJesaY1uR7ewg3SsmloHVfNXojFtKC-?usp=sharing>>

6.2.4 Atribuição de metabólitos do k -core máximo nas reações metabólicas

As listas de reações metabólicas de cada planta estudada neste trabalho, (veja tabela 2, Anexo A), foram avaliadas por meio de scripts computacionais escritos em linguagem awk, que verificavam a presença ou ausência de elementos contidos nos cernes centrais das redes metabólicas. O número de reações que continham pelo menos um elemento contido no cerne central foi gerado automaticamente pelos scripts escritos, contendo a lista de metabólitos pertencentes aos cernes centrais.

6.3 Resultados

Nós aplicamos o algoritmo de k -cores nas 17 redes metabólicas de plantas. A Figura 29-B mostra a percolação topológica da rede em camadas sucessivas, das quais obtem-se uma camada máxima onde os nodos se encontram completamente conectados. A atribuição química dos metabólitos contidos na camada central, mostra que eles pertencem ao metabolismo mais basal das plantas. Assim 14 metabólitos foram encontrados em comum nas camadas mais centrais das redes de todas as plantas estudadas: ADP, Amônia, AMP, ATP, CO_2 , Coenzima A, Difosfato, H^+ , H_2O , L-glutamato, NAD^+ , NADH, NADPH e Fosfato. A Figura 30 mostra os metabólitos presentes no nível mais central das redes das 17 plantas estudadas.

	BD	HV	OSJ	PV	SI	SB	ZM	AT	BRP	CP	GM	ME	PT	VV	SM	PP	CR
ADP																	
NH ₃																	
AMP																	
ATP																	
NaHCO ₃																	
CO ₂																	
Coenzima A																	
Difosfato																	
Glicina																	
H ⁺																	
H ₂ O																	
L-alanina																	
L-cisteína																	
L-glutamato																	
L-glutamina																	
L-fenilalanina																	
L-serina																	
L-triptofano																	
NAD ⁺																	
NADH																	
NADP ⁺																	
NADPH																	
oxigênio																	
oxaloacetato																	
Fosfato																	
Piruvato																	
2-oxoglutarato																	

Figura 30 – Metabólitos encontrados na camada mais central (k_{max}) das redes das plantas. As colunas indicam as siglas dos nomes específicos das plantas, os metabólitos são mostrados nas linhas. As células brancas da tabela indicam a presença de um metabólito no cerne (k_{max}), as células pretas indicam a sua ausência.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

Os 14 metabólitos comuns aos níveis mais centrais das redes das 17 plantas estudadas, representam nodos altamente conectados. Como previsto, estes nodos são metabólitos que compõe o nível mais básico do metabolismo de plantas.

A observação do decaimento dos metabólitos (desconexão), ao longo da percolação pelo algoritmo de k -core, mostra o mesmo padrão para todas as plantas estudadas. A percolação da rede de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, gera um cerne (k -core máximo) com 21 metabólitos, enquanto o nível mais externo da rede contém 3,546 metabólitos, dos quais 149 pertencem exclusivamente ao k_1 . Ocorre a diminuição no número de metabólitos por camada até o nível central. Observou-se que o número máximo de camadas (k_{max}), varia entre 16 e 18, entre as plantas estudadas. Os gráficos que relacionam o decaimento dos metabólitos ao longo da percolação por k -cores, são mostrados na Figura 31, eles quantificam o decaimento para 5 plantas pertencentes as 4 grandes classes taxonômicas uma clorófita, uma briófita, uma licófita, e duas angiospermas (veja classificação taxonômica na Figura 25).

Figura 31 – Gráfico que mostra o decaimento do metabólitos ao longo das camadas k -core nas redes metabólicas de *Chlamydomonas reinhardtii*, (CR) *Physicomitrella patens*, (PP) *Selaginella moellendorffii*, (SM) *Zea mays*(ZM) e *Arabidopsis thaliana*(AT), cada planta do gráfico respectivo está indicada de acordo com seu nome específico.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

6.3.1 Integração do metabolismo ao k -core central

A verificação de presença ou ausência de metabólitos contidos no nível central das redes, que participam das reações metabólicas das plantas estudadas, mostra que os metabólitos encontrados no k -core máximo, participam da imensa maioria das reações, isto é, a grande maioria das reações contém pelo menos 1 elemento que está contido na camada mais central das redes. Isto está mostrado no gráfico da Figura 32.

Figura 32 – Número de reações metabólicas de cada planta estudada neste trabalho com seu nome específico abreviado por sigla. O número de reações que contêm pelo menos um dos metabólitos encontrados no k -core máximo está representado pela barra azul do gráfico, caso contrário as reações estão quantificadas pela barra cinza.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

Os resultados mostrados anteriormente, quantificam a integração de todas as reações metabólicas descritas nas 17 plantas estudadas, com os metabólitos do cerne central.

6.3.2 Módulos e k -cores

Sabe-se que as redes metabólicas dos seres vivos tem uma estrutura modular e hierárquica.³⁷ Para acessarmos os níveis de modularização das redes metabólicas de plantas, nós avaliamos as conectividades cruzadas entre as classes metabólicas e também da camada de conectividade mais interna da rede metabólica de *Arabidopsis thaliana*. Os resultados de conectividade cruzada estão mostrados no gráfico da Figura 33 a seguir.

Figura 33 – Número de conexões entre classes. O Nome de cada classe está referido de acordo com sua cor. O eixo das abcissas posiciona as 5 classes de metabólitos descritas e não é numérico. O número de conexões para cada uma destas classes está indicado no eixo das ordenadas. Cada barra no gráfico indica o número de conexões atingidas entre os elementos da classe referida com as classes descritas no eixo das abcissas. O gráfico circular mostrado abaixo, a direita, quantifica as proporções que os nodos de cada classe atingem em relação ao total dos metabólitos avaliados.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

O gráfico mostrado na Figura 33 quantifica o alto nível de modularização da rede metabólica de *Arabidopsis thaliana*, demonstrado através do número de conexões entre os metabólitos pertencentes a uma mesma classe metabólica em relação as outras classes. Pode ser observado, por exemplo, no primeiro gráfico da Figura 33, que os lipídeos se conectam aos demais lipídeos e aos metabólitos contidos no nível mais central dos k -cores (cerne central), em uma proporção muito maior do que com as outras classes metabólicas.

É importante enfatizar que existem diferenças entre os números absolutos de metabólitos contidos em cada classe metabólica, o que está quantificado pelo gráfico circular mostrado na parte inferior direita da Figura 33. Por exemplo, o número de metabólitos no k -core máximo de *Arabidopsis thaliana* é de apenas 21, enquanto o de lipídeos é aproximadamente 500, não obstante, o número absoluto de conexões entre lipídeos e os

Figura 34 – Gráfico da proporção de metabólitos comuns em relação ao conteúdo total de metabólitos presentes em cada camada k -core das redes metabólicas de *Chlamydomonas reinhardtii*, (CR) *Physicomitrella patens*, (PP) *Selaginella moelendorffi*, (SM) *Zea mays*(ZM) e *Arabidopsis thaliana*(AT), cada planta do gráfico respectivo está indicada na legenda por sua sigla e símbolo.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

metabólitos do k -core máximo é de 600 e o número de conexões entre os metabólitos contidos no k -core máximo e os lipídeos é 587. Portanto, os elementos do k -core máximo se conectam proporcionalmente em um nível muito mais elevado aos lipídeos do que os lipídeos ao k -core máximo. O mesmo pode ser observado para as conexões das demais classes. Portanto fica evidente que a rede metabólica de *Arabidopsis thaliana* é modularizada e conectada centralizadamente aos metabólitos pertencentes ao nível mais basal do metabolismo.

6.3.3 Distribuição e atribuição de classes nos k -core

Nós analisamos a proporção dos metabólitos comuns entre todas as plantas estudadas, em relação ao conteúdo completo de metabólitos contidos nas k -camadas das redes. A Figura 34 mostra a distribuição dos metabólitos comuns das plantas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physicomitrella patens*, *Selaginella moelendorffi*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*.

Figura 35 – Gráfico da porcentagem de metabólitos secundários em relação ao conteúdo total de metabólitos presentes em cada camada de percolação k -core nas redes metabólicas de *Chlamydomonas reinhardtii*, (CR) *Physicomitrella patens*, (PP) *Selaginella moelendorffi*, (SM) *Zea mays*(ZM) e *Arabidopsis thaliana*(AT). Cada planta do gráfico respectivo está indicada na legenda ao lado por sua sigla e símbolo.

Fonte: Adaptada de ALMEIDA FILHO; MACHICAO; BRUNO. ⁶¹

A proporção dos metabólitos comuns ao longo das camadas k -core, quantificada no gráfico da Figura 34, mostra que o conteúdo do metabolismo comum entre plantas, está centrado nas k -camadas mais internas, nas quais os metabólitos comuns chegam a quase totalidade do conteúdo das camadas.

A análise prévia foi repetida também para analisar o conteúdo dos metabólitos secundários das plantas ao longo das k -camadas. A Figura 35 mostra a distribuição de metabólitos secundários em cada k -core, para as mesmas 5 plantas mostradas na Figura 34.

O gráfico da Figura 35 mostra que os metabólitos secundários estão concentrados na periferia das redes (k -cores externos) e ausentes nas camadas internas. Embora algas, briófitas e licófitas contenham proporcionalmente uma quantidade muito menor de metabólitos secundários em relação a angiospermas, nós observamos que, mesmo nas espécies destas classes, os metabólitos secundários também tem localização periférica ao longo das k -camadas. A partir da comparação dos resultados mostrados na Figura 34 com aqueles

mostrados na Figura 35, pode-se observar claramente que existe uma relação oposta entre a distribuição de metabólitos comuns e secundários ao longo das camadas k -core das redes de todas as 17 plantas. Este fato sugere que existe uma correlação entre a especialização do metabolismo e a hierarquia estabelecida pela decomposição da rede em camadas k -core.

Portanto conclui-se que a atribuição química dos metabólitos contidos nos k -cores, provê informação sobre a especialização do metabolismo. Isto sugere que a evolução do metabolismo pode ser modelada através da decomposição em k -cores de redes metabólicas.

Sabe-se que a especialização do metabolismo de plantas segue um padrão de descendência com modificações, isto é, espécies mais proximamente relacionadas dividem grupos de reações metabólicas mais similares entre si.²⁵ Portanto, pode-se supor que a visualização da especialização do metabolismo pode ser feita através de ferramentas como o algoritmo de k -cores, já que a localização nas camadas mostra hierarquias diferenciadas entre o metabolismo basal e secundário. Ao mesmo tempo a informação de que o metabolismo é integrado em módulos³⁷ (veja Figuras 33 e 3) e completamente centralizado em um cerne, sugere que a maquinaria metabólica tem módulos conectados centralmente.

É possível, portanto, propor uma topologia geral para a distribuição de matéria do metabolismo, que se baseia em módulos centralizados em um cerne, sendo o próprio cerne, um dos módulos da rede. A figura 36 mostra um modelo para a topologia geral de distribuição de matéria no metabolismo de plantas, que é uma hipótese baseada nos resultados obtidos neste trabalho.

Pode-se observar da figura 36, que um cerne centralizador conecta todos os módulos da rede. A presença de um cerne central na estrutura de uma única rede metabólica de planta, induz a suposição de que a estrutura centralizadora do metabolismo também explique a sua evolução de maneira geral. Esta suposição deriva do fato de que o funcionamento de todo o metabolismo de uma planta está ancorado no metabolismo basal (veja Figura 32 e Figura 34). Portanto, é possível que ao longo da evolução do metabolismo dos seres vivos, um cerne central básico tenha sido gradativamente adicionado de novos elementos ao longo do tempo. O resumo do que ocorreu durante milhares de anos de evolução, pode estar topologicamente representado no metabolismo de um único ser vivo por meio das interações entre componentes centrais e periféricos deste metabolismo.

Figura 36 – Modelo topológico modular (módulos em forma de triângulos coloridos) e presença de cerne integrador (cerne hexagonal de cor laranja).

Fonte: Elaborada pelo autor

7 CONCLUSÃO

É possível obter informação sobre a biologia de plantas, por meio de conexão de elementos dos seus sistemas morfofisiológicos, através de grafos ou redes. Os resultados obtidos neste trabalho com redes metabólicas e redes de estômatos confirmam este fato.

As medidas morfométricas de densidade estomática e distância média entre estômatos nas 6 espécies de plantas estudadas neste trabalho, geraram as informações iniciais sobre os parâmetros utilizados para modelagem de grafos obtidos a partir da distribuição de estômatos em imagens microscópicas. As variações das distâncias médias entre estômatos sob efeito de mudanças nas condições ambientais, também foram calculadas para provar que a variável utilizada para modelar os grafos tem variação mensurável, o que permite distinguir grupos de plantas de diferentes espécies, expostas a diferentes condições ambientais. Embora as medidas de densidade estomática sejam relacionadas com as condições ambientais a qual as plantas estão expostas, sendo um dos parâmetros mais utilizados na quantificação de plasticidade fenotípica^{41, 64, 6, 17}, o mesmo não se aplica a medidas de distância entre estômatos, que embora muito informativas, não tem sido extensivamente utilizada como medida de plasticidade fenotípica. A possibilidade de obtenção de matrizes de distâncias que quantificam a distribuição de estômatos observados em imagens microscópicas, permite a obtenção de parâmetros precisos sobre a morfologia da epiderme. Neste trabalho, nós obtivemos matrizes de distância entre estômatos obtidas a partir de imagens microscópicas de folhas vivas. Além de revelar as condições locais da epiderme da folha em tempo real, esta estratégia é uma medida adicional que pode ser utilizada nas inferências sobre como a ecologia está relacionada a morfologia microscópica das folhas.

Os grafos modelados a partir da geometria da distribuição de estômatos geram um grande espectro de parâmetros de rede relacionados com a distância entre estômatos. A variação das medidas obtidas com os grafos, em plantas de mesma espécie, expostas a diferentes condições ambientais, é capaz de discernir grupos de plantas de acordo com a sua aclimação ambiental. Portanto os grafos gerados se relacionam indiretamente com as condições físicas do meio ambiente. As medidas obtidas com os grafos de estômatos é mais informativa em termos quantitativos, do que as medidas obtidas diretamente a partir de distâncias entre estômatos, já que gera um espectro de redes para cada imagem microscópica de determinada área de uma folha. Isto deriva do fato de que grafos diferentes podem ser obtidos de uma mesma imagem microscópica se critérios de conectividade baseado em distâncias entre estômatos forem variados. Assim, é possível obter medidas indiretas de distância, por meio de variadas escalas de conectividade em grafos, isto permite discernir diferenças sutis na geometria de distribuição de estômatos. Apenas

alguns poucos trabalhos tem investigado a plasticidade fenotípica em plantas por meio de medidas em grafos⁸, logo espera-se que em um planeta sob condições ambientais em plena transformação, se explore cada vez mais ferramentas capazes de medir respostas de adaptação da fisiologia e morfologia de plantas ao meio ambiente. Portanto a aplicação das ferramentas de medida de plasticidade estomática propostas neste trabalho, apenas se inicia. Ao mesmo tempo, a ciência que investiga quais as redes moleculares são responsáveis pela plasticidade estomática em folhas está apenas em sua infância, já que não existe informação sobre o comportamento e interação coletiva de vias moleculares responsáveis pelos fenômenos celulares. Não obstante, tem-se proposto que é possível que se modele estas interações por meio de redes complexas.¹⁷ Por este motivo, esperamos que experimentos futuros nos permitam correlacionar medidas de redes geométricas de estômatos com medidas de redes moleculares responsáveis pela alteração na distribuição destas células sobre a epiderme.

Redes metabólicas de 17 plantas foram estudadas neste trabalho. O tamanho destas redes mostra que o número de metabólitos e de reações metabólicas varia em grandes proporções entre as plantas e está relacionado com as relações de parentesco filogenético (veja figura 23 e tabela 3). Entretanto os parâmetros topológicos globais das redes relativos a estatística e estrutura da conectividade, como o seu diâmetro e o expoente da lei de potência, não se alteram entre as espécies estudadas. Estes resultados mostram que a topologia global das redes metabólicas de plantas é conservada e que o modelo utilizado na sua modelagem gera redes do tipo livre-escala. Modelos para modelagem de redes metabólicas diferentes do utilizado neste trabalho, também tem gerado redes do tipo livre escala. Esta coincidência sugere que, não obstante aos elementos do metabolismo que se modele, quer sejam enzimas ou metabólitos, existe uma tendência geral a que se formem nodos altamente conectados que são elementos centrais que coordenam funções metabólicas distintas.²³

As medidas topológicas locais obtidas dos nodos das redes, mostram variações que são mensuráveis dentro de conjuntos contendo os mesmos nodos, pertencentes a plantas diferentes. A partir destas medidas organizadas como vetores de características, foi possível agrupar plantas que apresentaram menor co-variação das medidas em classes que também estão mais próximas em termos de parentesco filogenético (veja figura 27). Este resultado permite concluir que existe um conteúdo significativo de sinal filogenético que pode ser relacionado a medidas de topologia local de redes metabólicas. Ao mesmo tempo, pode-se supor que a modelagem da rede como foi concebida neste trabalho, reflete algum fenômeno natural de interação entre os componentes metabólicos das plantas, que nós supomos que seja as relações de formação-decomposição de matéria, já que as redes metabólicas foram modeladas com base no sentido termodinâmico de formação/decomposição de produtos e substratos das reações metabólicas.

A fragmentação das redes metabólicas de plantas em camadas de conectividade crescente, por meio do algoritmo de k -cores, mostrou que os metabólitos contidos no nível mais conectado das redes participam da grande maioria das reações metabólicas de plantas. A distribuição de matéria gerada pelo metabolismo deriva das reações químicas, logo é possível supor que a decomposição da rede em camadas de conectividade, revelem informação sobre a topologia da distribuição de matéria nos seres vivos.

Alguns trabalhos tem mostrado que a evolução do metabolismo de plantas seguiu um padrão de descendência com modificação, em que grupos mais proximamente relacionados de espécies dividem conjuntos de reações metabólicas mais similares.²⁵ Este fato somado a evidência de que as reações químicas tem sido acumuladas desde o ancestral comum de todas as plantas, abre questões sobre como ocorreu esta evolução e se existe uma topologia geral que permite mostrar um padrão sobre o qual o metabolismo evolui. A observação dos estados dinâmicos das redes metabólicas por meio de alguma ferramenta que gere hierarquia de conectividade, permite correlacionar a topologia observada, com a evolução do metabolismo. O algoritmo de k -cores gera hierarquias de conectividade em redes. Então pode-se supor que a evolução molecular do metabolismo pode ser simulada por este algoritmo? Embora nós não possamos afirmar esta suposição, nós podemos investigar qual informação que a atribuição química dentro das camadas k -core pode revelar. Esta atribuição nos mostrou inicialmente que os metabólitos comuns entre as plantas se concentram nas camadas k -cores mais internas das redes e que o metabolismo secundário é superficial. Além disso, ela nos mostra que os componentes químicos presentes no cerne mais conectado das redes metabólicas se conectam a outros componentes em uma proporção da ordem de 10.000 vezes maior do que a conectividade média entre os demais componentes das redes. Ao mesmo tempo, estes componentes participam em mais de 90% de todas as reações metabólicas conhecidas em plantas. Somadas, estas informações revelam que a decomposição em k -cores é uma boa ferramenta para se estudar a evolução do metabolismo dos seres vivos e que deve ser investigado se o que ocorre durante a decomposição das redes metabólicas, simula a evolução do metabolismo. Além disso, a estrutura da distribuição de matéria nos seres vivos pode também ser estudada por k -cores e deve-se investigar se os cerne de redes metabólicas gerados por k -core, reflete a unidade de processamento central de matéria do metabolismo. Entende-se por unidade de processamento central do metabolismo, o conjunto de moléculas conservadas em todas as plantas que gera a sua distribuição de matéria por meio da participação na grande maioria de suas reações metabólicas, também denominado de arcabouço molecular básico.⁶¹

Aspectos fundamentais da biologia podem estar relacionados com o arcabouço molecular básico. Por exemplo, estrutura da distribuição de matéria nos seres vivos e a sua evolução. Aparentemente o cerne evolutivo do metabolismo é também o arcabouço do metabolismo basal de organismos recentes, isto é, organismos recentes tem uma unidade de processamento central no seu metabolismo, que é a mesma da encontrada em orga-

nismos primitivos, embora possivelmente os organismos primitivos contivessem apenas um módulo compacto e os organismos recentes tenham se especializado e formado novos módulos metabólicos.

Os resultados obtidos com o algoritmo de k -core, aplicado a redes metabólicas de plantas, bem como as descobertas recentes que mostram a modularização das redes metabólicas ³⁷, tornam possível propor uma topologia geral para a distribuição de matéria do metabolismo baseada em módulos centralizados em um cerne, em que o próprio cerne é um dos módulos da rede de distribuição de matéria, como já proposto na figura 36, que ilustra um modelo para a topologia geral de distribuição de matéria nos seres vivos.

Por último é importante salientar que a estrutura proposta para o metabolismo não reflete a organização espacial de componentes metabólicos e nem mostra o seu desenho de interação inter-molecular por contato físico e espacial. Ela é simplesmente uma abstração lógica sobre as relações de formação e decomposição dos metabólitos. O modelo mostra, portanto, a hierarquia de existência ou inexistência de matéria em uma rede de interações de formação-decomposição de moléculas. Supõe-se que esta lógica molecular evolui com o tempo. O modelo sob o qual as redes metabólicas de planta foram modeladas, neste trabalho, se baseia em uma rede de formação-decomposição de matéria e é apenas uma abstração do que ocorre com moléculas em uma unidade do universo definida no espaço-tempo, as próprias máquinas vivas.

7.1 Artigos publicados

Florindo, J. B., Landini, G., Almeida-Filho, H., Bruno, O. M. (2015). Analysis of stomata distribution patterns for quantification of the foliar plasticity of *Tradescantia zebrina*. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 633, No. 1, p. 012113). IOP Publishing. ⁸

Almeida Filho, H., Machicao, J., Bruno, O. M. (2017, December). Geometry from stomata networks at leaves of the *Ctenanthe oppenheimiana*. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 936, No. 1, p. 012085). IOP Publishing. ⁶⁵

Almeida Filho, H., Machicao, J., Bruno, O. M. (2017, December). Geometric plasticity at leaves from *Ctenanthe oppenheimiana* probed by measure of distances between stomata. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 936, No. 1, p. 012094). IOP Publishing. ⁶⁶

Almeida-Filho, H., Machicao, J., Bruno, O. M. (2018, January). A hierarchical model of metabolic machinery based on the k -core decomposition of plant metabolic networks. ⁶¹

7.2 Artigos submetidos

Machicao, J., Almeida-Filho, H., Bruno, O. M. Can plant metabolic networks reveal evolutionary information? SREP-15-27796 ³⁵

REFERÊNCIAS

- 1 FIELD, C. B. et al. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, n. 5374, p. 237–240, 1998.
- 2 PALMER, J. D.; SOLTIS, D. E.; CHASE, M. W. The plant tree of life: an overview and some points of view. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1437–1445, 2004.
- 3 RAVEN, J. A. Selection pressures on stomatal evolution. **New Phytologist**, v. 153, n. 3, p. 371–386, 2002.
- 4 CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p. 9–23, 2008.
- 5 BROWNLEE, C. The long and the short of stomatal density signals. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 10, p. 441–442, 2001.
- 6 WOODWARD, F.; KELLY, C. The influence of co₂ concentration on stomatal density. **New Phytologist**, v. 131, n. 3, p. 311–327, 1995.
- 7 GAY, A.; HURD, R. The influence of light on stomatal density in the tomato. **New Phytologist**, v. 75, n. 1, p. 37–46, 1975. -doi: 10.1111/j.1469-8137.1975.tb01368.x.
- 8 FLORINDO, J. B.; LANDINI, G.; ALMEIDA-FILHO, H.; BRUNO, O. M. Analysis of stomata distribution patterns for quantification of the foliar plasticity of *Tradescantia zebrina*. **Journal of Physics**, v. 633, n. 1, p. 012–113, 2015.
- 9 KORNBERG, H. Krebs and his trinity of cycles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 225–228, 2000.
- 10 NETWORK, P. M. **PlantCyc**. 2009. Disponível em: <www.plantcyc.org/>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- 11 ZHANG, P. et al. Creation of a genome-wide metabolic pathway database for populus trichocarpa using a new approach for reconstruction and curation of metabolic pathways for plants. **Plant Physiology**, v. 153, n. 4, p. 1479–1491, 2010.
- 12 CASPI, R. et al. The metacyc database of metabolic pathways and enzymes and the biocyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. supplement 1, p. D623–D631, 2007.
- 13 SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 537–542, 2000.
- 14 SILVA, N. R. D. et al. Leaf epidermis images for robust identification of plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25994, 2016. -doi:10.1038/srep25994.
- 15 BACKES, A. R.; CASANOVA, D.; BRUNO, O. M. A complex network-based approach for boundary shape analysis. **Pattern Recognition**, v. 42, n. 1, p. 54–67, 2009.

- 16 PAGOLA, M. et al. New method to assess barley nitrogen nutrition status based on image colour analysis: comparison with spad-502. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 65, n. 2, p. 213–218, 2009.
- 17 HETHERINGTON, A. M.; WOODWARD, F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 901, 2003.
- 18 JACKSON, R. B. et al. Water in a changing world. **Ecological Applications**, v. 11, n. 4, p. 1027–1045, 2001.
- 19 CRAMER, W. et al. Global response of terrestrial ecosystem structure and function to co₂ and climate change: results from six dynamic global vegetation models. **Global Change Biology**, v. 7, n. 4, p. 357–373, 2001.
- 20 CIAIS, P. et al. A three-dimensional synthesis study of $\delta^{18}\text{O}$ in atmospheric co₂: 1. surface fluxes. **Journal of Geophysical Research**, v. 102, n. D5, p. 5857–5872, 1997.
- 21 WEBB, A. A.; HETHERINGTON, A. M. Convergence of the abscisic acid, co₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. **Plant Physiology**, v. 114, n. 4, p. 1557–1560, 1997.
- 22 KINOSHITA, T. et al. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. **Nature**, v. 414, n. 6864, p. 656–660, 2001.
- 23 JEONG, H. et al. The large-scale organization of metabolic networks. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 651–654, 2000.
- 24 OMRANIAN, N. et al. Differential metabolic and coexpression networks of plant metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 266–268, 2015.
- 25 CHAE, L. et al. Genomic signatures of specialized metabolism in plants. **Science**, v. 344, n. 6183, p. 510–513, 2014.
- 26 ALBERT, R.; BARABÁSI, A.-L. Statistical mechanics of complex networks. **Reviews of Modern Physics**, v. 74, n. 1, p. 47, 2002.
- 27 KARP, P. D.; KRUMMENACKER, M.; PALEY, S.; WAGG, J. Integrated pathway–genome databases and their role in drug discovery. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 275–281, 1999.
- 28 BARABÁSI, A.-L.; ALBERT, R. Emergence of scaling in random networks. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 509–512, 1999.
- 29 ERDOS, P.; RÉNYI, A. On the evolution of random graphs. **Publication of the Mathematical Institute of the Hungarian Academy of Sciences**, v. 5, n. 1, p. 17–60, 1960.
- 30 BARABÁSI, A.-L.; RAVASZ, E.; VICSEK, T. Deterministic scale-free networks. **Physica A**, v. 299, n. 3, p. 559–564, 2001.
- 31 CRUCITTI, P.; LATORA, V.; MARCHIORI, M.; RAPISARDA, A. Error and attack tolerance of complex networks. **Physica A**, v. 340, n. 1, p. 388–394, 2004.
- 32 BARABASI, A.-L.; OLTVAI, Z. N. Network biology: understanding the cell’s functional organization. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 2, p. 101, 2004.

- 33 KLAMT, S.; HAUS, U.-U.; THEIS, F. Hypergraphs and cellular networks. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 5, p. e1000385, 2009.
- 34 ZHAO, J. et al. Complex networks theory for analyzing metabolic networks. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 13, p. 1529–1537, 2006.
- 35 ALMEIDA-FILHO, H.; MACHICAO, J.; BRUNO, O. M. Can plant metabolic networks reveal evolutionary information? **Scientific Reports**, 2017. Submetido.
- 36 GUIMERA, R.; AMARAL, L. A. N. Functional cartography of complex metabolic networks. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 895–900, 2005.
- 37 RAVASZ, E. et al. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. **Science**, v. 297, n. 5586, p. 1551–1555, 2002.
- 38 DOROGOVTSSEV, S. N.; GOLTSEV, A. V.; MENDES, J. F. F. k -core organization of complex networks. **Physical Review Letters**, v. 96, p. 040601, 2006. -doi:0.1103/PhysRevLett.96.040601.
- 39 WUCHTY, S.; ALMAAS, E. Peeling the yeast protein network. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 444–449, 2005.
- 40 JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, special issue, p. 387–398, 1998.
- 41 JC, B. Effects of humidity on stomatal density and its relation to leaf conductance. **Scientia Horticulturae**, v. 48, n. 3-4, p. 205–212, 1991.
- 42 HUGHES, N. M.; VOGELMANN, T. C.; SMITH, W. K. Optical effects of abaxial anthocyanin on absorption of red wavelengths by understorey species: revisiting the back-scatter hypothesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3435–3442, 2008.
- 43 ECKERSON, S. H. The number and size of the stomata. **Botanical Gazette**, v. 46, n. 3, p. 221–224, 1908.
- 44 JAYNES, E. T. Information theory and statistical mechanics. **Physical Review**, v. 106, n. 4, p. 620, 1957.
- 45 ZHANG, P. et al. Metacyc and aracyc. metabolic pathway databases for plant research. **Plant Physiology**, v. 138, n. 1, p. 27–37, 2005.
- 46 MUELLER, L. A.; ZHANG, P.; RHEE, S. Y. Aracyc: a biochemical pathway database for arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 453–460, 2003.
- 47 BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. et al. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. **Icwsn**, v. 8, p. 361–362, 2009. Disponível em: <<https://www.aaai.org/ocs/index.php/ICWSM/09/paper/view/154/1009>>. Acesso em 08 Jan. 2015.
- 48 RENSING, S. et al. The physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. **Science**, v. 319, n. 5859, p. 64–69, 2008.
- 49 Arabidopsis Genome Initiative and et.al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant arabidopsis thaliana. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796, 2000.

- 50 COSTA, L. d. F.; RODRIGUES, F. A.; TRAVIESO, G.; BOAS, P. R. V. Characterization of complex networks: A survey of measurements. **Advances in Physics**, v. 56, n. 1, p. 167–242, 2007.
- 51 BANERJEE, A. Structural distance and evolutionary relationship of networks. **Biosystems**, v. 107, n. 3, p. 186–196, 2012.
- 52 FEDERHEN, S. The ncbi taxonomy database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D136–D143, 2012.
- 53 RUHFEL, B. R. et al. From algae to angiosperms—inferring the phylogeny of green plants (viridiplantae) from 360 plastid genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 23, 2014.
- 54 BENSON, D. A. et al. Genbank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36–D42, 2012.
- 55 KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- 56 NGUYEN, L.-T.; SCHMIDT, H. A.; HAESELER, A. von; MINH, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.
- 57 SOKAL, R.; MICHENER, C. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v. 38, pt2, p. 1409–1438, 1958.
- 58 FARRIS, J. S. On the cophenetic correlation coefficient. **Systematic Zoology**, v. 18, n. 3, p. 279–285, 1969.
- 59 KIRSCHNER, M.; GERHART, J.; MITCHISON, T. Molecular “vitalism”. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 79–88, 2000.
- 60 SCHNEIDER, E. D.; KAY, J. J. Life as a manifestation of the second law of thermodynamics. **Mathematical and Computer Modelling**, v. 19, n. 6-8, p. 25–48, 1994.
- 61 ALMEIDA-FILHO, H.; MACHICAO, J.; BRUNO, O. M. A hierarchical model of metabolic machinery based on the *k*-core decomposition of plant metabolic networks. **PloS One**, v. 13, n. 5, p. e0195843, 2018.
- 62 ROBBINS, A. D. **Gawk: effective AWK Programming**. 2004. Boston: Free Software Foundation.
- 63 KIM, S. et al. Pubchem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2015.
- 64 CAMARGO, M. A. B.; MARENCO, R. A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest trees species in central amazonia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, 2010. -doi:10.1590/S0044-59672011000200004.
- 65 ALMEIDA-FILHO, H.; MACHICAO, J.; BRUNO, O. M. Geometry from stomata networks at leaves of the *Ctenanthe oppenheimiana*. **Journal of Physics**, v. 936, n. 1, p. 012085, 2017.

- 66 _____. Geometric plasticity at leaves from *Ctenanthe oppenheimiana* probed by measure of distances between stomata. **Journal of Physics**, v. 936, n. 1, p. 012–094, 2017.
- 67 SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 671–674, 1997.

Apêndices

APÊNDICE A – APENDICE(S)

A.1 Achados empíricos

Durante a realização deste trabalho nós fizemos algumas observações ocasionais que ocorreram por consequência da investigação experimental com as plantas.

A.1.1 A plasticidade de cor em *Oxalis atropurpurea*

Nós observamos um povoamento da planta *Oxalis atropurpurea* no gramado do prédio principal do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, em uma área aproximada de 50 m^2 com coordenadas geográficas aproximadas de -22.007^0 (S) ; -47.894^0 (W). Este gramado é muito visitado por várias espécies de pássaros e pode ter recebido os esporos da planta pelo ar e trazidos pelos pássaros. Além disso várias pessoas circulam pelo local, onde existe uma lanchonete.

Plantas *Oxalis atropurpurea* crescidas em ambiente de sombra desenvolviam coloração roxa - quando estavam sob a copa de uma árvore ou em estratos inferiores do gramado. Entretanto quando elas estavam em locais com irradiação direta do sol, desenvolviam coloração verde em suas folhas. A figura a seguir mostra uma imagem de folhas da superfície abaxial da planta *Oxalis atropurpurea* com colorações roxa e verde.

Figura 37 – Folhas de *Oxalis atropurpurea* aumentada 7,5×; escala em vermelho

Fonte: Elaborada pelo autor.

Não obstante a coloração roxa e verde das folhas de *Oxalis atropurpurea*, a planta mantém estômatos verdes na epiderme abaxial. Imagens microscópicas em aumento 100× da epiderme abaxial da planta são mostradas a seguir.

Realizou-se, então, um experimento em que pequenas sementes (tubérculos), foram plantados e cresceram em ambiente iluminado por luz de LED (ligh enhancement dispositive), sob fluxo luminoso em torno de $140 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$. É importante observar que o fluxo de luz sob as plantas crescidas sob irradiação solar no gramado, pode chegar a $3000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ em picos solares diretos ao meio dia (12:00 horas). Portanto a adaptação das plantas ao LED, no fluxo relatado anteriormente, supostamente simula uma sombra.

Após brotação e 20 dias de crescimento da planta sob luz de LEDs, nós contamos o número de indivíduos que apresentavam folhas roxas. Ao mesmo tempo observamos no ambiente externo indivíduos de mesmo tamanho (comprimento da raiz até a folha apical) e efetuamos a mesma contagem. Os dados referentes estão mostrados no gráfico a seguir

Figura 38 – Epiderme abaxial de folhas de *Oxalis atropurpurea* aumentada 100×; escala em vermelho

Fonte: Elaborada pelo autor.

A pigmentação da folha por cor roxa, supostamente ocorre devido a presença de pigmentos conhecidos como antocianinas, que são pigmentos que tem absorção máxima de luz em comprimentos de onda entre 500 e 600nm. Assim nós fizemos a extração etanólica total (etanol + HCL 1%) dos pigmentos da folha e realizamos espectroscopia de absorção entre 200 e 1000 nm. O espectro de absorção para pigmentos extraídos de folhas visivelmente roxas e verdes está mostrado a seguir.

Os espectro mostra que tanto folhas roxas quanto folhas verdes apresentam clorofila A, esta apresenta máximos de absorção em 450 e 650nm, contudo, observamos uma banda de absorção entre 500 e 600nm apenas no extrato do pigmento da folha de cor roxa. Provavelmente os pigmentos responsáveis pela absorção entre 500 e 600 nm são de Antocianinas.

A observação de que pigmentos roxos aparecem em maior quantidade em plantas adaptadas a condições de sombra é uma novidade, já que muitos trabalhos tem relatado que as antocianinas são responsáveis por diminuir os níveis de oxidação e as espécies reativas de oxigênio geradas pela fotossíntese em plantas.⁶⁷ Neste caso, embora as antocianinas possam se prestar como antioxidantes, também em *Oxalis atropurpurea*, elas não absorvem luz entre 500 e 600nm, em plantas adaptadas ao sol, como mostrado no espectro acima. Este fato não invalida a presença e nem a produção destes pigmentos

Figura 39 – Proporção de indivíduos de *Oxalis atropurpurea* com coloração roxa aclimatados a luz solar e a luz de LED em baixo fluxo (N=80)

Fonte: Elaborada pelo autor.

em plantas expostas a alta irradiação solar, tendo em vista que a sua oxidação muda as características do seu espectro de absorção. Neste caso os pigmentos oxidados não mais absorvem luz verde (entre 500 e 600 nm). Nós oxidamos, in vitro, o pigmento extraído de folhas de plantas roxas. Os espectros de absorção para o mesmo pigmento antes e após oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são mostrados na figura 41.

Figura 40 – Espectro de absorção

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 – Espectro de absorção de pigmento oxidado e não oxidado

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se no espectro da figura 41, que o conjunto de pigmentos extraídos da folha roxa da planta *Oxalis atropurpurea*, não mais absorve luz entre 500 e 600nm quando são oxidados. Desta forma podemos pensar que o mesmo pode ocorrer in-vivo. Assim, possivelmente, o pigmento é produzido em plantas expostas a altas taxas de irradiação solar, embora seja oxidado por espécies reativas de oxigênio produzidas na fotossíntese, sob altas taxas de fluxo luminoso; por isso perdem a sua cor roxa. Entretanto esta suposição ainda requer investigações.

Algumas perguntas surgem da simples observação do fenômeno de mudança de cor em *Oxalis atropurpurea*. Primeiro: Porque as plantas apresentam pigmento roxo na sombra? Segundo: Porque os seus estômatos permanecem verdes, em uma epiderme roxa.

Algumas hipóteses podem ser elaboradas. Uma hipótese é a de que o pigmento roxo reflete luz azul e vermelha para dentro da própria epiderme e assim otimiza a fotossíntese, por refletir luz nos comprimentos de onda em que a clorofila A tem os máximos de absorção. Esta luz seria refletida nas condições ambientais em que os fluxos de luz fotossinteticamente ativa estão em quantidades baixas. Ao mesmo tempo este fenômeno de reflexão também conhecido por propagação retrógrada (back propagation) ⁴², otimiza a fotossíntese dentro dos próprios estômatos verdes, quando a luz vermelha e azul proveniente do sol não está plenamente disponível.

A.1.2 Alta infestação por protozoários em plantas invenenadas por NaF

Nós observamos uma infestação massiva por protozoários do gênero *Colpoda* e um incistamento não usual destes protozoários em folhas de plantas *Tradescantia minima* em putrefação. Este fato ocorreu após exposição de plantas a altos níveis de fluoreto de sódio (NaF).

Algumas dúvidas surgiram destas observações; a primeira delas é porque protozoários *Colpoda* estavam em uma população tão elevada em folhas que foram expostas a níveis diários de 60mg/l de NaF ? Uma hipótese para o que ocorreu está no fato de o NaF se acumular no solo das plantas sob exposição contínua, o que tornou a sua concentração no solo muito maior do que 60mg/l. Esta condição possivelmente poderia causar quimiotaxia negativa dos protozoários para regiões onde o NaF estava em concentração mais baixa. Contudo, nos impressionou a alta população dos protozoários, seus movimentos ciliares rápidos e não usuais, seu incistamento na folha e seu habito alimentar bacteriófago. Aliás, esta última observação, faz parte de um dos fatores pelos quais possivelmente os protozoários se reproduziram em tal quantidade. Provavelmente a alta população de bactérias nas folhas envenenadas, gerou a disponibilidade de alimentos não usual. Enfim, uma série de fatores em conjunção podem ter gerado os fatos observados.

Todas as observações foram filmadas e os vídeos estão disponíveis nos endereços de internet a seguir:

<<https://www.youtube.com/watch?v=AtjEqsLmu0U&t=121s>>

<<https://www.youtube.com/watch?v=i0RP7uBo3h4&t=100s>>

<<https://www.youtube.com/watch?v=i0RP7uBo3h4>>

<<https://www.youtube.com/watch?v=mrKSHPknqLE>>

<<https://www.youtube.com/watch?v=79tv-xltPxU&t=111s>>

A metodologia empregada que resultou na observação dos *Colpoda* está descrita na seção a seguir.

A.1.3 Exposição de plantas *Tradescantia minima* a NaF

Tomou-se amostras de brotos de plantas, gerados a partir do mesmo clone, plantou-se em frascos erlenmeyers contendo 100 ml de substrato de crescimento de plantas Carolina soil do Brasil, os erlenmeyers foram fechados com algodão no topo para permitir troca gasosa. As plantas foram aclimatadas em câmeras de crescimento controlado Eletrolab EL212/4G-RS com umidade relativa de 55%, fotoperíodo de 12 horas sob fluxo de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$, temperatura de 25°C para o dia e 25°C para a noite. A irrigação foi feita uma vez ao dia com 15 ml de tampão fosfato 20mm pH = 7,2, por meio de spray foliar. A aclimação ocorreu durante 7 dias na câmera de crescimento controlado. Após este período de crescimento inicial, as plantas começaram a ser tratadas com concentrações diferentes de fluoreto de sódio. As plantas foram divididas em 8 grupos experimentais (G0-G7), G0 foi referido como grupo controle. As soluções de irrigação foram preparadas a partir da diluição seriada de fluoreto de sódio em tampão fosfato 20mm pH = 7,2, de acordo com o grupo experimental respectivo: G0 = 0 mg/l; G1 = 0,25mg/l; G2 = 0,5 mg/l; G3 = 1mg/l; G4 = 5mg/l; G5 = 15mg/l; G6 = 30mg/l e G7 = 60 mg/l. As plantas foram então irrigadas uma vez ao dia através de spray contendo 10ml das soluções referidas acima. O tratamento durou 7 dias com o acúmulo final de 70 ml de solução em cada frasco erlenmeyr.

A.1.4 Protozoários em inquilinismo com ácaro

Um ácaro bacteriófago da família histiostomatídea, foi observado ingerindo bactérias em alta velocidade pelo seu sistema sugador em escova. Observou-se parasitos em inquilinismo aderidos a saída e a entrada do tubo digestivo do ácaro. O ácaro foi observado em uma folha da planta *Tradescantia minima* em putrefação e foi filmado através da câmera acoplada ao microscópio zeiss axiolab-A1, com magnificação de 100X. Esta observação nos chamou a atenção primeiro pelo hábito alimentar do ácaro e segundo pelo fato de protozoários saprofíticos se aderirem a este estranho ser vivo. Um vídeo do ácaro está disponível no endereço de internet a seguir.

<<https://www.youtube.com/watch?v=GyZumk6hvJA>>

A.1.5 Vermes emergindo de ostíolos

Observou-se um helminto emergir de dentro de um ostíolo em uma folha em putrefação da espécie *Tradescantia minima*. O filme de um dos helminto emergindo de dentro do poro de um ostíolo, está disponível no endereço de internet a seguir:

https://www.youtube.com/watch?v=PcsvS_zkLC0

A.1.6 Paredes celulares verdes na epiderme de *Ctenante oppenheimiana*

A observação de coloração verde nas paredes celulares de folhas da planta *Ctenante oppenheimiana*, nos chamou a atenção durante a coleta de imagens da epiderme abaxial para o desenvolvimento deste trabalho. Especial atenção foi dada, devido ao fato de não ser comum a observação desta cor em tais estruturas morfológicas. Nós acreditamos que a presença de clorofila na parede celular visível a microscopia de luz, não seja ocasional e exista uma correlação funcional. Nossa hipótese é a de que as paredes celulares nesta planta, possam realizar fotossíntese afim de prover energia para o transporte iônico e de H_2O na epiderme com eficiência otimizada. Estudos mais detalhados acerca desta observação tem de ser feitos, sobretudo a averigação de quais estruturas moleculares, proteínas, carboidratos e pigmentos, formam a parede destas células pavimentosas, já que possivelmente as respostas de tais investigações poderão lançar um novo paradigma no estudo de fotossíntese de plantas. Este paradigma é o que a fotossíntese se acopla ao transporte de íons e H_2O dentro de paredes celulares. Ao mesmo tempo investigações acerca de nossa hipótese devem contribuir para o entendimento global dos mecanismos energéticos que sustentam os transportes ativos nestas plantas, que são plantas brasileiras, monocotiledôneas, de crescimento rápido e com provável fixação de carbono pela fotossíntese do tipo C4.

A figura 42 seguir mostra uma imagem da superfície abaxial da folha viva da planta *Ctenante oppenheimiana*, gerada por microscopia óptica em aumento 200 $\times$.

Figura 42 – Imagem da superfície abaxial da folha de *Ctenante oppenheimiana* em aumento 200×. Detalhe de paredes celulares verdes entre células pavimentosas

Fonte: Elaborada pelo autor.

Anexos

ANEXO A – REDES METABÓLICAS DE PLANTAS

A.1 Base de dados de reações Plantcyc

Tabela 2 – Lista de referências da internet para as reações metabólicas utilizadas neste estudo encontradas na base de dados do PlantCyc.¹⁰

Plant	Database of reactions
<i>Brachypodium distachyon</i>	< https://pmn.plantcyc.org/BRACHYPODIUM/class-instances?object=Reactions >
<i>Hordeum vulgare</i>	< https://pmn.plantcyc.org/BARLEY/class-instances?object=Reactions >
<i>Oryza sativa japonica</i>	< https://pmn.plantcyc.org/ORYZA/class-instances?object=Reactions >
<i>Panicum virgatum</i>	< https://pmn.plantcyc.org/SWITCHGRASS/class-instances?object=Reactions >
<i>Setaria italica</i>	< https://pmn.plantcyc.org/SETARIA/class-instances?object=Reactions >
<i>Sorghum bicolor</i>	< https://pmn.plantcyc.org/SORGHUMBICOLOR/class-instances?object=Reactions >
<i>Zea mays</i>	< https://pmn.plantcyc.org/CORN/class-instances?object=Reactions >
<i>Arabidopsis thaliana col</i>	< https://pmn.plantcyc.org/ARA/class-instances?object=Reactions >
<i>Brassica rapa pekinensis</i>	< https://pmn.plantcyc.org/CHINESECABBAGE/class-instances?object=Reactions >
<i>Carica papaya</i>	< https://pmn.plantcyc.org/PAPAYA/class-instances?object=Reactions >
<i>Glycine max</i>	< https://pmn.plantcyc.org/SOY/class-instances?object=Reactions >
<i>Manihot esculenta</i>	< https://pmn.plantcyc.org/CASSAVA/class-instances?object=Reactions >
<i>Populus trichocarpa</i>	< https://pmn.plantcyc.org/POPLAR/class-instances?object=Reactions >
<i>Vitis vinifera</i>	< https://pmn.plantcyc.org/GRAPE/class-instances?object=Reactions >
<i>Selaginella moellendorffii</i>	< https://pmn.plantcyc.org/SELAGINELLA/class-instances?object=Reactions >
<i>Physcomitrella patens</i>	< https://pmn.plantcyc.org/MOSS/class-instances?object=Reactions >
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	< https://pmn.plantcyc.org/CHLAMY/class-instances?object=Reactions >

Fonte: Elaborada pelo autor.

A.2 Número de metabólitos e reações

Tabela 3 – Valores de números de reações (R) e nodos das redes (N) para cada planta da base de dados *Plantcyc*, as plantas estão indicadas pelas siglas de suas espécies. O Número médio de reações $\langle R \rangle$ e de metabólitos $\langle N \rangle$ está indicado para cada classe de planta.

Classe	Planta	R	N	$\langle R \rangle$ /classe	$\langle N \rangle$ /classe
Monocotiledôneas	BD	2865	3107	2888,6 ($\pm 34, 2$)	3125.0($\pm 40, 8$)
	HV	2837	3059		
	OSJ	2936	3178		
	PV	2920	3165		
	SI	2878	3111		
	SB	2877	3108		
	ZM	2907	3146		
Dicotiledôneas	AT	3442	3546	3079.3(± 165.4)	3267.9(± 128.6)
	BRP	3051	3250		
	CP	2945	3156		
	GM	3050	3242		
	ME	3003	3210		
	PT	3068	3274		
	VV	2996	3197		
<i>Licófitas</i>	SM	2675	2924		
<i>Briófitas</i>	PP	2651	2858		
<i>Clorófitas</i>	CR	2208	2433		

Fonte: Elaborada pelo autor.

A.3 Medidas topológicas globais

Tabela 4 – Classe taxonômica (primeira coluna), sigla do nome específico da planta (segunda coluna), grau médio ($\langle K \rangle$) (terceira coluna), comprimento médio de via ($\langle L \rangle$) (quarta coluna), expoentes da lei de potência $\gamma_{entrada}$ (quinta coluna), γ_{saida} (sexta coluna).

Classe	Planta	$\langle K \rangle$	L	$\gamma_{entrada}$	γ_{saida}
Monocotiledôneas	BD	4,65	3,17	2,86	2,78
	HV	4,73	3,13	2,85	2,78
	OSJ	4,65	3,18	2,86	2,78
	PV	4,69	3,15	2,86	2,78
	SI	4,69	3,13	2,84	2,76
	SB	4,66	3,15	2,85	2,78
	ZM	4,62	3,14	2,88	2,8
Dicotiledôneas	AT	4,62	3,18	2,82	2,73
	BRP	4,62	3,17	2,83	2,77
	CP	4,64	3,16	2,86	2,78
	GM	4,69	3,15	2,85	2,77
	ME	4,71	3,16	2,84	2,76
	PT	4,72	3,14	2,84	2,75
	VV	4,70	3,16	2,76	2,76
<i>Licófitas</i>	SM	4,74	3,15	2,81	2,77
<i>Briófitas</i>	PP	4,80	3,13	2,79	2,74
<i>Clorófitas</i>	CR	4,73	3,15	2,79	2,8

Fonte: Elaborada pelo autor.