

PATRÍCIA FRANÇA DE FREITAS

**ANATOMIA FOLIAR, ONTOGENIA E HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS EM ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Bixa orellana* L.
(BIXACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F866a
2009

Freitas, Patrícia França, 1977-

Anatomia foliar ontogenia e histoquímica das estruturas secretoras em órgãos vegetativos em *Bixa orellana* L. (Bixaceae) / Patrícia França Freitas. – Viçosa, MG, 2009. vi, 57f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marília Contrin Ventrella.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Inclui bibliografia.

1. Urucum - Anatomia. 2. Urucum - Histoquímica.
3. Urucum - Ontogenia. 4. *Bixa orellana*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

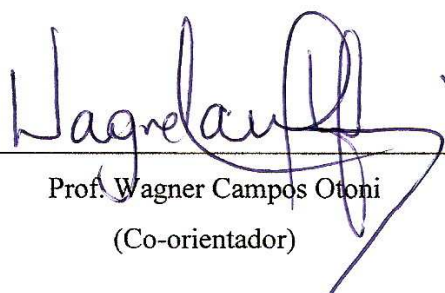
CDD 22. ed. 583.68


PATRÍCIA FRANÇA DE FREITAS

**ANATOMIA FOLIAR, ONTOGENIA E HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS EM ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Bixa orellana* L.
(BIXACEAE)**


Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 08 de maio de 2009


Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)


Prof. Élder Antônio Sousa e Paiva


Prof. Aristéa Alves Azevedo


Prof. Luzimar Campos da Silva


Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

À minha mãe, pela vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa.

À professora Marília Contin Ventrella, pela orientação e incentivo.

Aos membros da banca Élder Sousa e Paiva e Aristéa Alves Azevedo.

Aos meus co-orientadores Wagner Campos Otoni e João Paulo Viana Leite.

Aos membros da banca Élder Sousa e Paiva, Aristéa Alves Azevedo e Luzimar Campos da Silva.

A todos os professores, pelo aprendizado durante o curso.

Aos colegas e amigos do mestrado, Advanio, Alice, Claudinéia, Elyabe, Flávia, Jaquelina, Luiz, Patrícia Nolasco, Pedro Paulo, Rúbia e Víctor, pela companhia.

Ao Ângelo e à Francine, funcionários do Departamento de Biologia Vegetal.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, pela estrutura disponível.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Bárbara, Diego, Diogo, Jaque, Josi, Karina, Leonor, Marina, Naiara, Patrícia Luísa, Rafaela, Thiago e Tuane, pela troca de aprendizado e conversas animadas durante o cafezinho.

À Claudinéia, pelas alegrias e saudades compartilhadas.

Às minhas amigas de sempre, Aninha, Das Dores e Kiriaki, e à minha querida prima Soráya, por todo o apoio, incentivo, abraço, sorriso, cuidado e amizade.

À minha família, especialmente à minha mãe Graça e meus irmãos Pablo e Paula, saibam que foi difícil suportar a saudade, mas o amor que sinto por vocês me conduziu até aqui.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1. Anatomia da folha de <i>Bixa orellana</i> L. (Bixaceae)	10
Resumo	10
Introdução	11
Material e Métodos	12
Resultados	14
Discussão	22
Conclusões	24
Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO 2. Estruturas secretoras em órgãos vegetativos de <i>Bixa orellana</i> L. (Bixaceae): distribuição, ontogenia e histoquímica	29
Resumo	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados	33
Discussão	48
Conclusões	51
Referências Bibliográficas	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

RESUMO

FREITAS, Patrícia França, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2009.
Anatomia foliar, ontogenia e histoquímica das estruturas secretoras em órgãos vegetativos de *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Orientadora: Marília Contin Ventrella.
Co-Orientadores: Wagner Campos Otoni e João Paulo Viana Leite.

Bixa orellana L., conhecida como colorau ou urucum, é nativa da América do Sul e se destaca pela importância econômica, principalmente na indústria alimentícia, como fornecedora de um corante natural avermelhado retirado do tegumento das sementes. Este trabalho teve como objetivos caracterizar a anatomia da folha de *B. orellana*, o desenvolvimento das estruturas secretoras e análise histoquímica da secreção. Porções de ápices de parte aérea, folhas, caules e raízes, em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% ou FAA₅₀, estocadas em etanol 70% e incluídas em metacrilato, seguindo o processamento usual para microscopia de luz. A diafanização foi conduzida para o estudo da venação. Para a análise histoquímica, material fresco foi seccionado em micrótomo de mesa e submetido a diversos corantes e reagentes. Para a caracterização micromorfológica, o material foi submetido às técnicas usuais para microscopia eletrônica de varredura. A análise anatômica da folha indica que *B. orellana* segue os padrões anatômicos gerais já relatados para Bixaceae, mas apresenta detalhadamente a distribuição de estruturas secretoras. Tricomas peltados são abundantes nos ápices caulinares, mas se tornam senescentes e esparsos em órgãos em expansão. A ontogenia dos tricomas peltados segue o padrão encontrado em tricomas secretores, mas a secreção (terpenos e flavonóides) fica acumulada nas células da cabeça, sem a formação de um espaço subcuticular típico. Estruturas secretoras de bixina ocorrem em todos os órgãos vegetativos e têm origem e desenvolvimento pluricelulares. Há incorporação gradativa de células que têm paredes comuns degradadas, formando uma estrutura pluricelular delimitada pelas paredes externas remanescentes, que progride com a formação de um espaço central, degradação de núcleos e acúmulo de secreção lipídica. Os canais, que secretam mucilagem e ocorrem apenas na parte aérea, têm desenvolvimento lisígeno. Células taníferas ocorrem associadas ao tecido vascular em todos os órgãos vegetativos. Análises ultra-estruturais são necessárias para o esclarecimento de questões relacionadas ao desenvolvimento das estruturas secretoras de *B. orellana*, como a confirmação da origem e desenvolvimento pluricelular das estruturas secretoras de bixina, o processo de síntese da bixina e a compartimentalização da secreção nos tricomas peltados.

ABSTRACT

FREITAS, Patrícia França, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2009. **Leaf anatomy, ontogeny and histochemistry of secretory structures in vegetative organs of *Bixa orellana* L. (Bixaceae).** Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: Wagner Campos Otoni and João Paulo Viana Leite.

Bixa orellana L., known as anatto, is native of South America and represent economic value, especially in food industry, as a natural reddish dye, obtained from the seed tegument. This work aimed to characterize the anatomy of *B. orellana* leaves, the development of secretory structures and histochemical analysis of the secretion. Samples of shoot apex, leaves, stems and roots, at different growth stages are fixed in 2,5% glutaraldehyde or in FAA₅₀, storage in 70% ethanol and embedded in methacrylate, following the usual procedure for light microscopy. Diaphanization was carried out for venation study. For histochemical analysis, fresh samples was sectioned in a table-microtome and submitted to dyes and reagents. For micromorphological analysis, the samples were submitted to the usual procedures for scanning electron microscopy. The leaves morphoanatomical analysis shows that *B. orellana* follows the standard anatomical features just recorded for the Bixaceae, but shows occurrence and distribution of secretory structures with details. Peltate trichomes occur in shoot apex, but they get senescent and sparse in expanding organs. Peltate trichomes ontogeny follows the standard way as in secretory trichomes, but the secretion (terpenes and flavonoids) get stored in head cells, without the formation of a typical subcuticular space. Bixin secretory structures occur in all vegetative organs and their origin and development are pluricellular. There is a gradual fusion of cells, in what the common cell walls are degraded, forming a pluricellular structure, delimited by the remaining external cell walls, that gives rise with the formation of a central space, nuclear degradation and storage of lipidic secretion. The ducts, that yield mucilage and occur just in the shoot, show lysigenous development. Tannin cells are distributed along the vascular tissues in all vegetative organs. Ultrastructural analysis are needed to clarify some questions related to the development of *B. orellana* secretory structures, as the confirmation of the origin and pluricellular development of bixin secretory structures, the bixin synthesis process and the secretion compartmentalization in peltate trichomes.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Bixaceae Kunth encontra-se amplamente distribuída em regiões tropicais e possui o hábito predominantemente arbustivo, com algumas espécies arbóreas. Segundo Cronquist (1981, 1988), a família Bixaceae pertence à ordem Violales e consiste de três gêneros: *Amoreuxia* Moc. & Sessé ex DC. (quatro espécies), *Bixa* L. (três ou quatro espécies) e *Cochlospermum* Kunth (quinze espécies), sendo que apenas os dois últimos ocorrem no Brasil (BARROSO et al., 2004). Outros autores (METCALFE & CHALK, 1950; GENTRY, 1993; HEYWOOD, 1996; BARROSO et al., 2004) consideram o gênero *Bixa* como o único que representa a família Bixaceae, incluindo *Amoreuxia* e *Cochlospermum* na família Cochlospermaceae Planch. Poppendieck (1981) também propôs o tratamento separado das famílias Bixaceae e Cochlospermaceae, mas, em uma revisão taxonômica mais recente, indica Cochlospermaceae como sinônimo de Bixaceae (POPPENDIECK, 2001). Já o APG II (2003) insere Bixaceae na ordem Malvales e considera Cochlospermaceae e Diegodendronaceae como sinônimos opcionais.

Alguns caracteres anatômicos são considerados diagnósticos para a família Bixaceae, em especial a presença de diferentes estruturas secretoras, como canais de mucilagem, células secretoras, tricomas peltados e nectários extraflorais (METCALFE & CHALK, 1988; 1989). O caule possui o floema estratificado, com raios parenquimáticos dilatados e canais de mucilagem na medula. Na folha, os feixes vasculares do pecíolo formam um anel quase que contínuo e os estômatos são anomocíticos. Cristais de oxalato de cálcio ocorrem no limbo e na região das nervuras, do pecíolo e também do caule, isolados ou agrupados (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1988; 1989).

O gênero *Bixa* é composto geralmente por arbustos e pequenas árvores, de folhas simples, alternas, flores em panículas, vistosas, estames numerosos, poricidas, ovário súpero, com placentação parietal, fruto cápsula loculicida e sementes com pigmentação vermelha (BARROSO et al., 2004).

Bixa orellana L. é a espécie mais conhecida dentre as do gênero *Bixa*, nativa da América do Sul, mas amplamente cultivada em várias partes do mundo (SCHERY, 1954; HAKUNO, 2005). Possui porte arbustivo, com três a cinco metros de altura, sendo facilmente distinguida por seu fruto característico e o pigmento vermelho que se desprende com facilidade da testa das sementes ao contato com a pele (LORENZI,

2002; LORENZI & MATOS, 2008). É bastante associada à região Amazônica, onde tribos indígenas usam o corante para tingir a pele, não apenas como adorno, mas como repelente de insetos e na proteção contra os raios ultravioleta do sol (PRANCE, 1976; RIZZINI & MORS, 1995; LORENZI, 2002; HAKUNO, 2005).

No Brasil, *B. orellana* é popularmente conhecida como urucum, urucu, colorau, açafroa e açafroeira-da-terra (LORENZI, 2002), mas também recebe diversas denominações em todo o mundo: achiote (Argentina, Bolívia, Cuba, Peru, Porto Rico, Santo Domingo); anatto (Inglaterra, Santo Domingo e Porto Rico); axiote (México); bija (Cuba); ditaque e kifasu (Angola); guajachote (El Salvador); orleans laum (Alemanha); roucou (França, Trindad e Tobago, Suriname); onotto e onotillo (Venezuela); shambu (Peru); urucu (Argentina), entre outros (MANFRED, 1940; MESA, 1945; FRANCO et al., 2002).

Destaca-se a grande importância econômica do urucum na indústria alimentícia, como fornecedora do “colorau”, um corante natural retirado da testa das sementes (PRANCE, 1976), que possui largo emprego para colorir alimentos, como manteiga, margarina, queijo, ovos, massas, sopas, sorvetes, sucos, entre outros (SCHERY, 1954; RIZZINI & MORS, 1995; FRANCO et al., 2002; HAKUNO, 2005). A espécie é bastante utilizada na indústria têxtil e de impressão (LORENZI, 2002; HAKUNO, 2005), como fonte de lenha e ornamental, por suas flores vistosas (LORENZI, 2002).

O urucum é amplamente reconhecido por seus usos na medicina popular e, dentre as atividades farmacológicas registradas, algumas já confirmam as indicações terapêuticas para a espécie, como a antibacteriana, antifúngica, antidiarréica e antiofídica (CÁCERES et al., 1995; OTERO et al., 2000; FLEISCHER et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007; LORENZI & MATOS, 2008). As sementes possuem o maior número de indicações, com o emprego na forma de chá, macerado ou xarope no tratamento de faringite, bronquite, asma, coqueluche, gripe (BRAGA, 1960; CRUZ, 1965; DI STASI et al., 1989; MORAIS et al., 2005; AGRA et al., 2007; 2008; LORENZI & MATOS, 2008), hipertensão, anemia e distúrbios gastro-intestinais (CRUZ, 1965; MOREIRA et al., 2002; ALMASSY JR. et al., 2005). O uso tópico serve como repelente de insetos e no tratamento de doenças de pele e queimaduras (SCHERY, 1954). Já as raízes são utilizadas como diuréticas, digestivas e cicatrizantes em processos inflamatórios (ALBUQUERQUE, 1989), enquanto que o decocto das folhas é usado nas fadigas (MOREIRA et al., 2002; AGRA et al., 2007; 2008), bronquites, faringites (ALBUQUERQUE, 1989) e como antitérmico (DI STASI et al., 1989).

Em outros países são reportados diferentes usos medicinais para o urucum. Em Cuba, a raiz é indicada para asma e a testa das sementes, misturada ao azeite, é aplicada nas queimaduras (MESA, 1945). Na Argentina, as folhas têm uso tópico nas cefaléias e em decocção na cura de inflamações da boca e garganta (MANFRED, 1940). Empregam-se as folhas e os ramos como antiofídico na Colômbia (OTERO et al., 2000). Em Trinidad e Tobago, as folhas e raízes são usadas no tratamento de diabetes, hipertensão e icterícia (LANS, 2006).

A investigação fitoquímica de *B. orellana* evidenciou a presença de óleos essenciais, carotenóides: bixina e nor-bixina, zeaxantina, β -caroteno; olerina, proteínas (caseína), fósforo, cálcio, além dos aminoácidos triptofano, lisina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e treonina (BRESSANI et al., 1983; WURTS & TORREBLANCA, 1983; MORRISON et al., 1991; BARBOSA-FILHO et al., 1997; CARVALHO, 1999; FERNANDES et al., 2002; GALINDO-CUSPINERA et al., 2002; ANTUNES et al., 2005, JÚNIOR et al., 2005; OYEDEJI et al., 2005). A bixina está incluída na classe dos carotenóides, um dos grupos mais abundantes de antioxidantes lipofílicos encontrados nos cloroplastos. Além da importância no metabolismo dos organismos fotossintetizantes, são considerados essenciais na dieta animal, como fontes de vitamina A (PENNA & POGSON, 2006).

Os estudos que envolvem morfodiagnoses macrocópicas e microcópicas são de extrema importância na determinação correta do material vegetal. Ao se analisar a estrutura interna de uma planta é possível indicar caracteres diagnósticos para uma determinada espécie, mesmo se o material não estiver íntegro (OLIVEIRA et al., 1998). As estruturas secretoras presentes, tanto externas quanto internas, não só servem como características diagnósticas na identificação de uma espécie, como produzem, armazenam e secretam muitos dos princípios ativos encontrados em plantas aromáticas e medicinais (FAHN, 1979; EVERT, 2006). Estas substâncias despertam o interesse de diversos setores da economia e são largamente empregadas na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, de perfumaria, entre outras (BUCHANAN et al., 2000).

Através de técnicas histoquímicas é possível a identificação e localização dos metabólitos produzidos nas estruturas secretoras correspondentes, enquanto que os estudos ontogenéticos esclarecem o processo de desenvolvimento da estrutura (ASCENSÃO & PAIS, 1987; CURTIS & LERSTEN, 1994; FAHN & SHIMONY, 1996; ASCENSÃO et al., 1999; SILVA & MACHADO, 1999; CICCARELLI et al., 2001; MOURA et al., 2005; LIANG et al., 2006; GIULIANI et al., 2008).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a anatomia foliar de *B. orellana*, avaliar a ontogenia das estruturas secretoras presentes nos órgãos vegetativos e identificar histoquimicamente os compostos secretados.

A dissertação está dividida em dois capítulos: “Anatomia da folha de *Bixa orellana* L. (Bixaceae)” e “Estruturas secretoras em órgãos vegetativos de *Bixa orellana* L. (Bixaceae): distribuição, ontogenia e histoquímica”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(1): 114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(3): 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 89p.
- ALMASSY JÚNIOR, A. A.; LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: UFV, 2005. 233p.
- ANTUNES, L. M.; PASCOAL, L. M.; BIANCHI, M. L.; DIAS, F. L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research** 585(1-2): 113-119, 2005.
- APG II - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 41: 399-436, 2003.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. M. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. **Annals of Botany** 84: 437-447, 1999.

- ASCENSÃO, L.; PAIS, M. S. S. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. **Botanical Gazette** 148(2): 221-227, 1987.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA-FILHO, R. N.; LIRA, B. F.; MACÊDO, R. O.; SILVA, M. S.; CHAVES, M. C. O.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 7/8: 41-47, 1997.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004. 308p. v. 1.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 111: 396-402, 2007.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. 540p.
- BRESSANI, R.; PORTA-ESPANA DE BARNEON, F.; BRAHAM, J. E.; ELIAS, L. G.; GÓMEZ-BRENES, R. Chemical composition, amino acid content and nutritive value of the protein of the annatto seed (*Bixa orellana* L.) **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 33(2): 356-376, 1983.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiology, 2000. 1367p.
- CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B. E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology** 48: 85-88, 1995.
- CARVALHO, P. R. Annatto: technological advances and perspectives. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 49: 71-73, 1999.
- CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A. C.; PAGNI, A. M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. **Annals of Botany** 88: 637-644, 2001.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Houghton Mifflin, 1988. 555p.
- CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil: suas curiosidades históricas e lendas**. 1. ed. Belo Horizonte: [s.n.], 1965. 811p. v. 11.
- CURTIS, J. D.; LERSTEN, N. R. Developmental anatomy of internal cavities of epidermal origin in leaves of *Polygonum* (Polygonaceae). **New Phytologist** 127: 761-770, 1994.
- DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIMURA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989. 143p.
- EVERT, R. F. **Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3. ed. New Jersey: Wiley Interscience, 2006. 601p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.
- FAHN, A.; SHIMONY, C. Glandular trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials. **Annals of Botany** 77: 25-34, 1996.
- FERNANDES, A. C.; ALMEIDA, C. A.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A.; FELZENSZWALB, I.; LAGE, C. L.; SÁ, C. C.; MOURA, A. S.; KOVARY, K.; Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13(7): 411-420, 2002.
- FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia** 74: 136-138, 2003.
- FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINÉLLI, I. S. C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. João Pessoa: Emepa, SAIA, 2002. 120p.
- GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of volatile compounds in water-and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50(7): 2010-2015, 2002.
- GENTRY, A. H. **A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa**. Washington, DC: Conservation International, 1993. 895p.

- GIULIANI, C.; PELLEGRINO, R.; TIRILLINI, B.; BINI, L. M. Micromorphological and chemical characterisation of *Stachys recta* L. subsp. *serpentini* (Fiori) Arrigoni in comparison to *Stachys recta* L. subsp. *recta* (Lamiaceae). **Flora** 203: 376-385, 2008.
- HAKUNO, D. Materials. In.: PRANCE, G.; NESBITT, M. (Ed.) **The cultural history of plants**. New York: Routledge, 2005. cap. 17, p. 335-353.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the World**. London: Batsford, 1996. 335p.
- JÚNIOR, A. C. T. S.; ASAD, L. M. B. O.; OLIVEIRA, E. B.; KOVARY, K.; ASAD, N. R.; FELZENSZWALB, I. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. **Genetics and Molecular Research** 4(1): 94-99, 2005.
- LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 2(45): 1-11, 2006.
- LIANG, S.; WU, H.; LUN, X.; LU, D. Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. **Journal of Integrative Plant Biology** 48(5): 573-583, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368p. v. 1.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MANFRED, L. **600 plantas medicinales argentinas y sudamericanas**. 2. ed. Rosario: [s.n.], 1940.
- MESA, J. T. R. **Plantas Medicinales**: aromáticas o venenosas de Cuba. Havana: Ministério da Agricultura, 1945. 165p. Parte 1.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950. 1500p. v. 2.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1988, 275p. v. 1.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: Wood structure and conclusion of the general introduction. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 297p. v. 2.

- MORAIS, S. M.; DANTAS, J. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15(2): 169-177, 2005.
- MOREIRA, R. C. T.; COSTA, L. C. B.; COSTA, R. C. S.; ROCHA, E. A. Abordagem entobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense** 21(3): 205-211, 2002.
- MORRISON, E. Y.; THOMPSON, H.; PASCOE, K.; WEST, M.; FLETCHER, C. Extraction of an hyperglycaemic principle from the annatto (*Bixa orellana*), a medicinal plant in the West Indies. **Tropical and Geographical Medicine** 43(1-2): 184-188, 1991.
- MOURA, M. Z. D.; ISAIAS, R. M. S.; SOARES, G. L. G. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 148: 427-431, 2005.
- NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, S. L.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 37: 969-977, 2004.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. 412p.
- OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, S. L. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology** 73: 233-241, 2000.
- OYEDEJI, O. A.; ADENIYI, B. A.; AJAYI, O.; KONIG, W. A. Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. **Phytotherapy Research** 19(4): 362-364, 2005.
- PENNA, D. D.; POGSON, B. J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. **Annual Review of Plant Biology** 57: 711-738, 2006.
- POPPENDIECK, H.-H. Bixaceae. In: STEVENS, W. D. ULLOA ULLOA, C.; POOL, A.; MONTIEL, O. M. (Ed.). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden** 85(1): 428-430, 2001.
- POPPENDIECK, H.-H. **Cochlospermaceae**. Flora Neotropica. Monograph 27. New York: The New York Botanical Garden, 1981. 33p.
- PRANCE, G. T. **Algumas flores da Amazônia**. Manaus: INPA, 1976. 56p.

- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 241p.
- SCHERY, R. W. **Plants for man**. London: George Allen & Unwin, 1954.
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 22(2): 117-124, 1999.
- SOLEREDER, H. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press, 1908. 1182p. v. 2.
- WURTS, M. L.; TORREBLANCA, R. A. Analysis of the seed of *Bixa orellana* L. (annatto) and the waste generated in the extraction of its pigments. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** 33(3): 606-619, 1983.

CAPÍTULO 1

Anatomia da folha de *Bixa orellana* L. (Bixaceae)

RESUMO – *Bixa orellana* L. (Bixaceae) é popularmente conhecida como urucum ou colorau, e destaca-se por sua grande importância econômica, principalmente na indústria alimentícia, como fornecedora do “colorau”, um corante natural retirado da testa das sementes. Este trabalho teve como objetivo a caracterização anatômica e micromorfológica da folha de *B. orellana*, visando maior conhecimento acerca dos aspectos estruturais da espécie. Porções das regiões basal, mediana e apical do pecíolo e do limbo foliar, bem como do bordo de folhas completamente expandidas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas, estocadas em etanol 70% e incluídas em metacrilato. O material foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo (5 µm), corado com azul de toluidina e montado sob lamínula com resina sintética. Para a análise do padrão de venação e das células epidérmicas, as folhas foram diafanizadas e dissociadas. Para a caracterização micromorfológica da folha, seguiram-se as técnicas usuais de microscopia eletrônica de varredura. A epiderme foliar de *B. orellana* apresenta células tabulares com cutícula delgada, estômatos em ambas as faces da folha, predominando na face abaxial, e tricomas peltados. O mesofilo é dorsiventral e apresenta idioblastos cristalíferos e estruturas secretoras de bixina. Os feixes vasculares são colaterais e associados a fibras e, na região das nervuras primárias e pecíolo também estão associados a colênquima. Células com conteúdo fenólico e estruturas secretoras de bixina ocorrem na região cortical de nervuras primárias e do pecíolo, e também associadas ao tecido vascular. Canais secretores ocorrem no córtex das nervuras primárias e no córtex e na medula do pecíolo. A análise anatômica da folha de *B. orellana* indica que a espécie segue os padrões anatômicos gerais já relatados para a família Bixaceae, mas revela um maior detalhamento de dados, principalmente em relação à ocorrência e distribuição de estruturas secretoras.

Introdução

Bixa orellana L. é a espécie mais conhecida dentre os membros da família Bixaceae, nativa da América do Sul, e amplamente cultivada em várias partes do mundo (SCHERY, 1954; HAKUNO, 2005). É perenifólia e heliófita, ocorrendo geralmente em solos férteis e úmidos, ao longo dos rios (LORENZI, 2002). Possui porte arbustivo, de três a cinco metros de altura, ramos novos ferrugíneos, folhas discolors, cálice não persistente, levemente ferruginoso, fruto tipo cápsula e sementes de coloração vermelha (LORENZI & MATOS, 2008).

No Brasil, são várias as denominações no âmbito popular: urucum, urucu, urucuzeiro, colorau, açafroa e açafroeira-da-terra (LORENZI, 2002; LORENZI & MATOS, 2008). Destaca-se por sua grande importância econômica, principalmente na indústria alimentícia, como fornecedora do “colorau” (PRANCE, 1976). Além disso, é amplamente reconhecida por seus usos na medicina popular e dentre as atividades farmacológicas registradas, algumas já confirmam as indicações terapêuticas para a espécie, como a antibacteriana, antifúngica, antidiarréica e antiofídica (CÁCERES et al., 1995; OTERO et al., 2000; FLEISCHER et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007; LORENZI & MATOS, 2008). Além das sementes, com o maior número de indicações (SCHERY, 1954; BRAGA, 1960; CRUZ, 1965; DI STASI et al., 1989; LORENZI & MATOS, 2008; MOREIRA et al., 2002; ALMASSY JR. et al., 2005; MORAIS et al., 2005; AGRA et al., 2007; 2008), as folhas e raízes também são usadas como diuréticas, digestivas e cicatrizantes em processos inflamatórios (ALBUQUERQUE, 1989), nas fadigas (MOREIRA et al., 2002; AGRA et al., 2007; 2008), bronquites, faringites (ALBUQUERQUE, 1989) e como antitérmico (DI STASI et al., 1989).

Dentre os compostos já identificados na investigação fitoquímica de *B. orellana*, destaca-se a bixina, um apocarotenóide monometil éster di-carboxílico, que confere a coloração vermelha à testa das sementes de urucum (PENNA & POGSON, 2006; STRINGHETA et al., 2008). Já se observaram efeitos na proteção ao DNA e conseqüente prevenção contra o câncer em estudos com a bixina (PAUMGARTTEN et al., 2002; ALVES DE LIMA et al., 2003; AGNER et al., 2004; 2005).

Alguns caracteres anatômicos são considerados diagnósticos para a família Bixaceae, em especial a presença de diferentes estruturas secretoras, como canais de

mucilagem, células secretoras, tricomas peltados e nectários extraflorais (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1950; 1988; 1989).

Análises anatômicas e micromorfológicas são importantes para a padronização do material botânico na fabricação de novos medicamentos e nas pesquisas científicas para a descoberta de novos princípios ativos, fornecendo uma certificação necessária e controle de qualidade ao produto (OLIVEIRA et al., 1998).

Apesar da importância econômica e das perspectivas de uso de *B. orellana*, a literatura referente à anatomia da espécie é antiga e discordante em alguns aspectos, com descrições generalistas e superficiais (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1950; KEATING, 1970). De modo geral, há escassez de estudos estruturais em comparação com outras áreas do conhecimento, como etnobotânica, farmacologia e fitoquímica. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização anatômica e micromorfológica da folha de *B. orellana*, visando ao maior conhecimento acerca dos aspectos estruturais da espécie e a ocorrência e distribuição de estruturas secretoras.

Material e Métodos

Material vegetal

Amostras de folhas completamente expandidas foram coletadas de plantas de *Bixa orellana* L., genótipo M1, cultivadas a pleno sol, que apresentam frutos avermelhados e alto teor de bixina (4,9%) (MANTOVANI, 2007), quando comparadas a outros genótipos mantidos e cultivados na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, Minas Gerais. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob número de registro 31977.

Microscopia de luz

Porções das regiões basal, mediana e apical do pecíolo e do limbo foliar, bem como do bordo de folhas completamente expandidas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940) ou utilizadas ainda frescas (inteiras ou seccionadas em micrótomo de mesa). Amostras fixadas, com

aproximadamente 0,5 cm², foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin® – Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material embocado foi seccionado transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 μm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permount).

Para a análise do padrão de venação e das células epidérmicas, as folhas foram diafanizadas, utilizando-se soluções de hidróxido de sódio 10% por duas horas e hipoclorito de sódio 20% até clarificação completa, intercalados por lavagens em água corrente. A coloração foi realizada com safranina 1% em solução alcoólica, fucsina básica ou violeta cristal, seguido de desidratação em série alcoólica/ xilólica crescente e montagem em resina sintética (Permount). O padrão geral observado foi descrito de acordo com Hickey (1979). Para o estudo complementar do tecido epidérmico, realizou-se a dissociação de epidermes, utilizando-se hipoclorito de sódio 50%, posteriormente a coloração com azul de astra e violeta cristal, seguida de desidratação em série alcoólica/ xilólica crescente e montagem em resina sintética (Permount).

A observação e a obtenção de imagens foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-PHOTO, acoplado a uma câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments Inc.) e a um microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, do Laboratório de Anatomia Vegetal (UFV).

Folhas frescas foram observadas ao microscópio estereoscópio (modelo Stemi 200-C, Zeiss) do Laboratório de Anatomia Vegetal (UFV) e as imagens obtidas com câmera fotográfica digital (modelo D-535, Olympus Optical).

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica da folha, amostras de aproximadamente 0,5 cm² da região mediana das folhas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As amostras foram desidratadas em série etanólica e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂, com aparelho adequado (modelo CPD 020, Bal-Tec). Após a fixação das amostras nos suportes com fita dupla-face, procedeu-se à deposição com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec). A observação e a captura de imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss) no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Resultados

Bixa orellana L. possui folhas simples, alternas, inteiras, cordiformes, membranáceas, de ápice acuminado e base cordada, pecíolo cilíndrico, alongado e pulvino nas porções proximal e distal (Figura 1A).

O padrão de venação é misto actinódromo-broquidódromo, com cinco nervuras primárias basais partindo do pecíolo e as nervuras secundárias se associando em arcos terminais. A nervura primária mediana é proeminente em relação às outras quatro nervuras primárias laterais (Figura 1A), que são curvadas. As nervuras secundárias divergem em ângulos agudos aproximadamente uniformes; apresentam curso curvado uniformemente, com arcos leves (Figura 1A). As ramificações são fechadas por arcos secundários, terciários ou quaternários e as nervuras intersecundárias são compostas, ou seja, coalescem com segmentos de nervuras terciárias (Figura 1A-B). As nervuras terciárias seguem um padrão predominantemente reticulado ortogonal. As ordens de venação superiores são distintas, sendo o curso da maioria das nervuras quaternárias e quintenárias em ângulo reto, e a última venação marginal formando arcos (Figura 1B-C). As nervuras terminais podem ser ausentes a ramificadas, representadas por traqueídes e muitas vezes associadas aos idioblastos. As aréolas são imperfeitas, distribuídas ao acaso e com formato irregular (Figura 1B-C).

Ambas as faces da folha são recobertas por tricomas peltados, distribuídos esparsamente pela folha, principalmente nas nervuras e pecíolo (Figura 2A-E). Os tricomas são formados por quatro células basais inseridas em depressões na epiderme, pedicelo multisseriado e cabeça multicelular em forma de disco achatado (Figura 2D-F). A cutícula é estriada, principalmente na face adaxial da folha (Figura 2A). Os estômatos estão localizados em ambas as faces foliares, entretanto, na superfície adaxial encontram-se apenas próximos às nervuras (Figura 2G). São do tipo anomocítico e aparecem um pouco acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 2H-I). Observa-se, em vista frontal, que as células epidérmicas apresentam paredes anticlinais retas a levemente sinuosas na face adaxial (Figura 2G) e sinuosas na abaxial (Figura 2H). Na região dos feixes vasculares, as células epidérmicas apresentam-se alongadas e com paredes anticlinais retas (Figura 2G).

As células epidérmicas são tabulares (Figura 3A), exceto na face adaxial da folha, na região das nervuras, onde têm formato semelhante à papila (Figura 4D). Não há grande variação de tamanho das células epidérmicas nas duas faces da folha (Figura

3C). O mesofilo, dorsiventral, é formado por duas a três camadas de células do parênquima paliçádico, onde a camada mais externa é composta por células mais alongadas e justapostas que as das camadas internas (Figura 3A, C).

Há estruturas secretoras de bixina distribuídas por todo o parênquima lacunoso, inclusive na margem foliar, e possuem formato de lobado a alongado, com prolongamentos que partem como ramificações, geralmente associadas aos feixes vasculares (Figura 3A-B, E). Em material fresco, o conteúdo dessas estruturas secretoras é vermelho-alaranjado, e em material incluído em metacrilato não é corado pelo azul de toluidina. Idioblastos cristalíferos, contendo drusas de oxalato de cálcio são comuns no tecido subjacente, destacando-se pelo tamanho e conteúdo, e estão presentes em camadas subepidérmicas, em ambas as faces do limbo foliar (Figura 3C-D). O bordo foliar apresenta-se fletido em direção à face abaxial da folha, tem forma arredondada e o colênquima na extremidade, em camada subepidérmica (Figura 3E).

A região das nervuras primárias medianas, em seção transversal, é convexa nas duas faces da folha e mais proeminente na face abaxial (Figura 4A-C). Colênquima do tipo angular é observado em camadas subepidérmicas, em ambas as faces da folha (Figura 4C, D). Uma calota de fibras envolve externamente o floema (Figura 4F). Nas porções basal e mediana da folha, a nervura apresenta sistema vascular em forma de arco fechado e quatro a cinco feixes acessórios, voltados para a face adaxial (Figura 4A-B). Já na porção apical, a nervura primária apresenta um feixe vascular principal em forma de arco mais aberto e menor, e apenas dois feixes acessórios (Figura 4C). Os feixes vasculares das nervuras de ordens superiores seguem o padrão colateral, com extensão de bainha esclerenquimática até a epiderme em ambas as faces (Figura 3A). Estruturas secretoras de bixina também estão presentes na região cortical das nervuras primárias e entre as células do floema (Figura 4A-C, E, H). Em seção longitudinal, as estruturas secretoras de bixina apresentam formato bem mais alongado que as da região da lâmina foliar (Figura 4I). Canais secretores de mucilagem são encontrados nas nervuras primárias, inseridos no parênquima fundamental, em camadas mais internas que as estruturas secretoras de bixina e próximos aos feixes vasculares (Figura 4A-D). Os canais são delimitados por uma ou duas camadas de células parenquimáticas achatadas e apresentam lúmen alongado, preenchido por conteúdo mucilaginoso (Figura 4D, J). Idioblastos cristalíferos, semelhantes aos encontrados na região da lâmina foliar, são abundantes nos tecidos que compõem as nervuras (Figura 4D, G, K), ocorrendo inclusive no epitélio que delimita o canal, nas bainhas ao longo dos feixes vasculares, entre as células do floema (Figura 4G, K). Células com conteúdo fenólico, coradas de

verde intenso pelo azul de toluidina, são encontradas ao longo das nervuras primárias e também nas nervuras de menor calibre, tanto no parênquima fundamental como no floema (Figura 4D, F-G).

O pecíolo apresenta seção transversal circular, e apenas na porção basal mostra-se discretamente plano-convexo (Figura 5A, C, F). A epiderme assemelha-se muito à encontrada nas nervuras primárias e colênquima do tipo angular ocorre em toda a extensão do pecíolo, em camadas subepidérmicas, sendo bem evidente na porção basal (Figura 5G). A área basal do pecíolo é mais dilatada, com córtex amplo, colenquimático. Os feixes são colaterais, em número de três na área medular e sem fibras (Figura 5F, H). A porção mediana apresenta um anel de fibras, intercalado com células com conteúdo fenólico, que também estão localizadas no floema e no parênquima fundamental (Figura 5C-D). Na região central é observado um feixe colateral isolado (Figura 5E). Já a porção apical possui características semelhantes às descritas para a mediana, distinguindo-se por uma menor densidade de fibras, córtex um pouco mais amplo e dois grupos de feixes inclusos na área medular (Figura 5A-B).

Canais secretores estão presentes na região cortical do pecíolo, próximos ao tecido vascular, e também na região medular (Figura 5A, C, D, F). Estruturas secretoras de bixina encontram-se na região cortical e também entre as células do floema (melhor visualizado em material fresco) (Figura 5D, G). Células com conteúdo fenólico ocorrem nos tecidos fundamentais e no floema (Figura 5B). Idioblastos cristalíferos também são abundantes no pecíolo, principalmente no parênquima fundamental (Figura 5G).

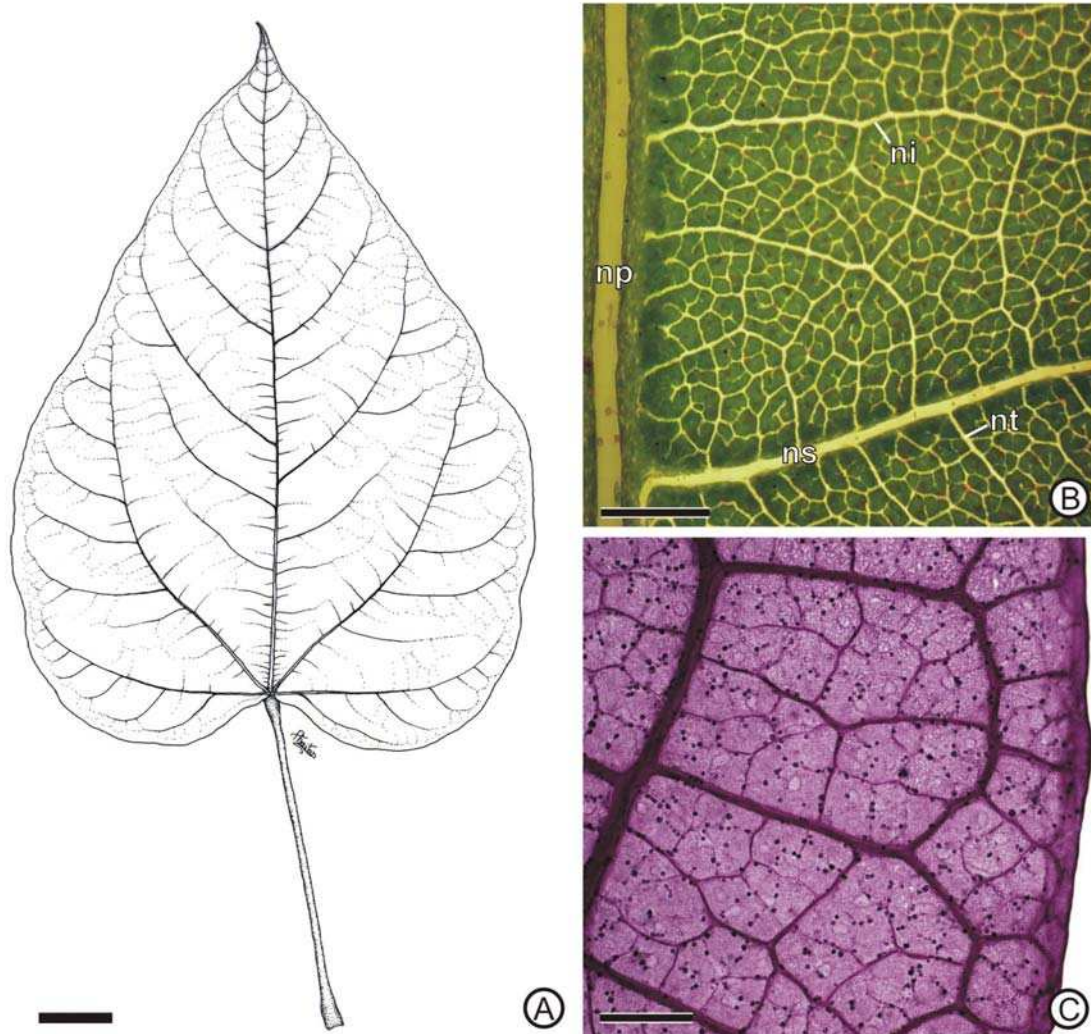


Figura 1. Folha de *Bixa orellana*. **A**, aspecto geral evidenciando o padrão de venação actinódromo-broquidódromo. **B**, limbo foliar em vista frontal, evidenciando as nervuras secundárias, intersecundárias e terciárias. **C**, detalhe da margem foliar em material diafanizado. Ni, nervura intersecundária; np, nervura primária mediana; ns, nervura secundária; nt, nervura terciária. Barra: A, 2 cm; B, 1 mm; C, 400 μ m.

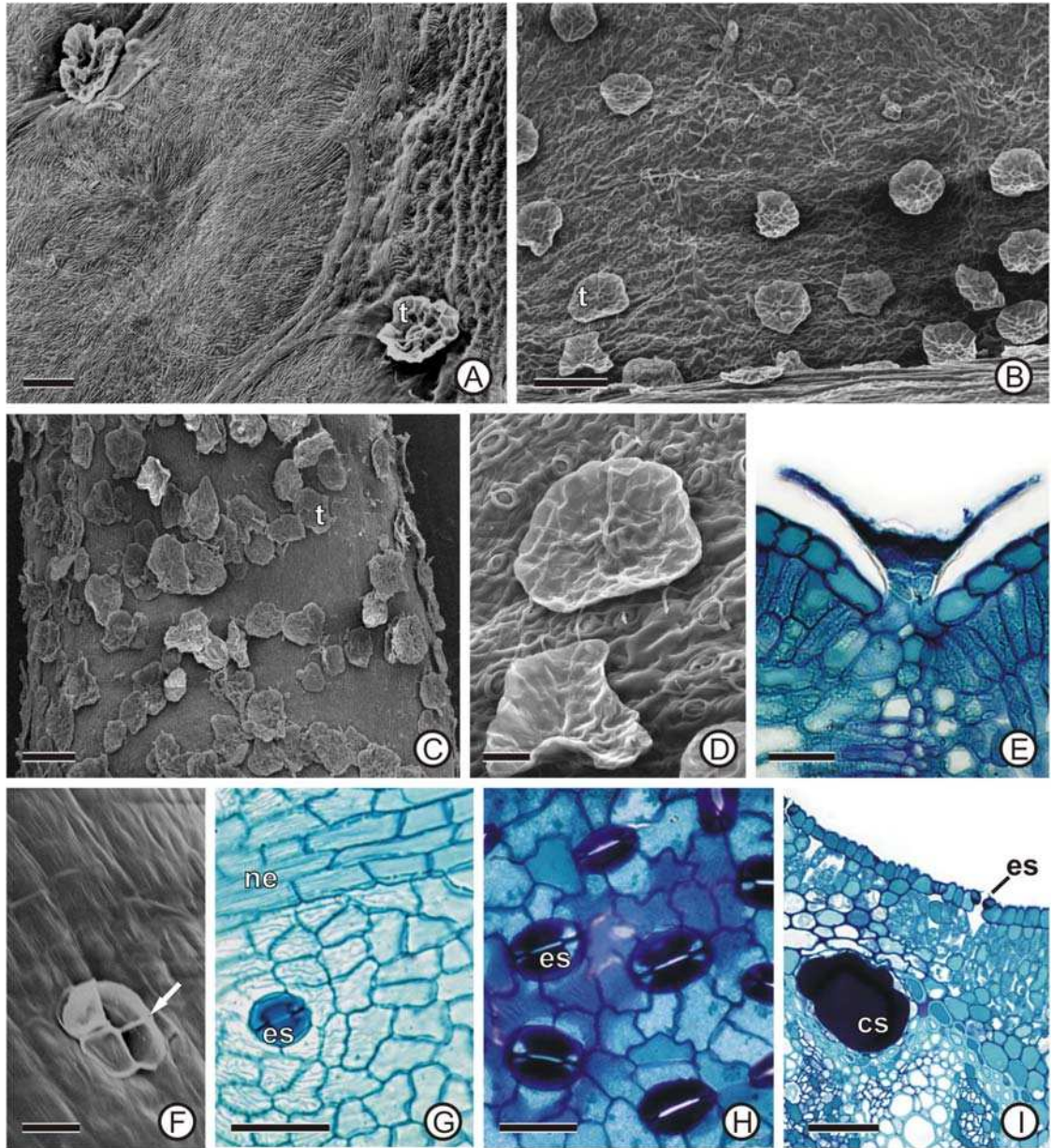


Figura 2. Superfície foliar de *Bixa orellana*. **A-B**, aspecto geral da superfície do limbo foliar nas faces adaxial (A) e abaxial (B). **C**, aspecto geral da superfície do pecíolo. **D-E**, detalhe de tricomas peltados na face adaxial. **F**, detalhe da base quadricelular do tricoma peltado (seta). **G-H**, epiderme da face adaxial (G) e abaxial (H). **I**, detalhe da folha em seção transversal. Es, estômato; ne, nervura; t, tricoma peltado. Barra: A, G, 30 μm ; B, C, I, 100 μm ; D, E, G, H, J, 20 μm ; F, 10 μm ; H, 30 μm .

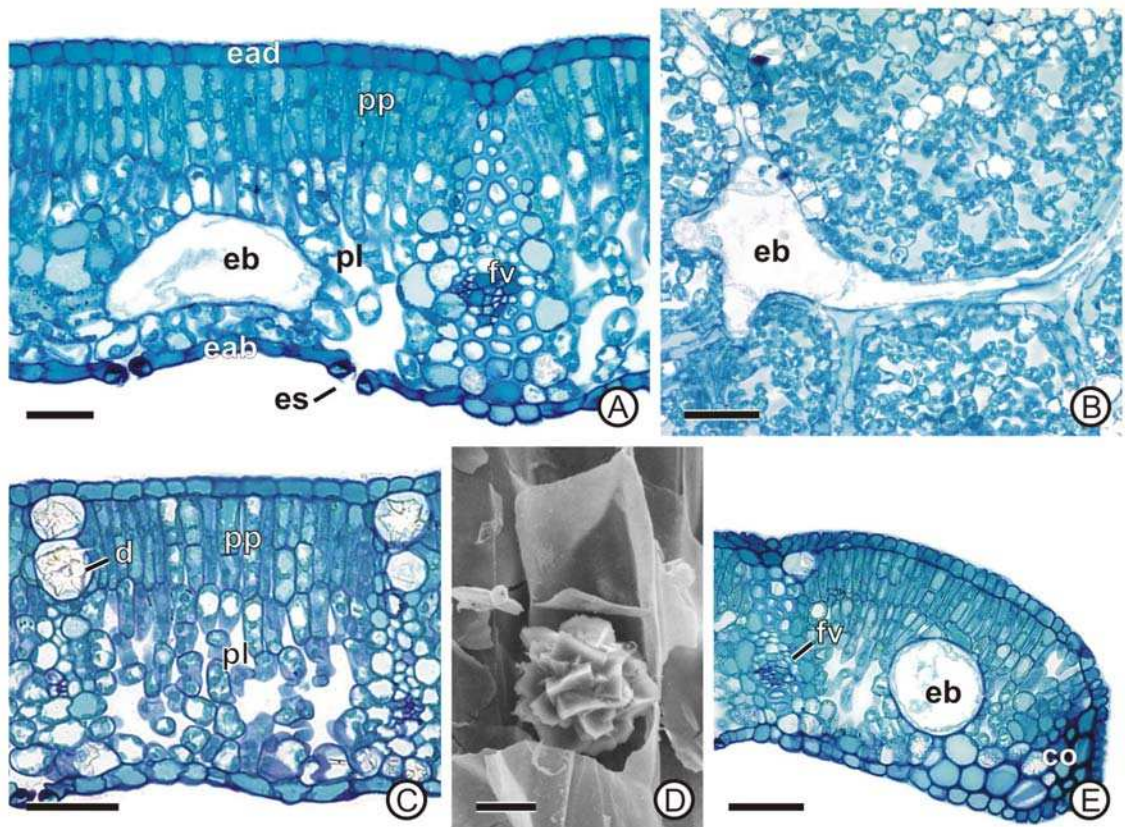


Figura 3. Lâmina foliar de *Bixa orellana*. **A-C**, aspecto geral da lâmina foliar em seção transversal (A, C-E) e paradérmica (B). **D**, detalhe de uma drusa na região parenquimática. **E**, região do bordo foliar. Co, colênquima; d, drusa; eab, epiderme da face abaxial; ead, epiderme da face adaxial; eb, estrutura secretora de bixina; es, estômato; fv, feixe vascular; pl, parênquima lacunoso; pp, parênquima paliçádico. Barra: A, B, C, 50 μm ; D, 10 μm ; E, 50 μm .

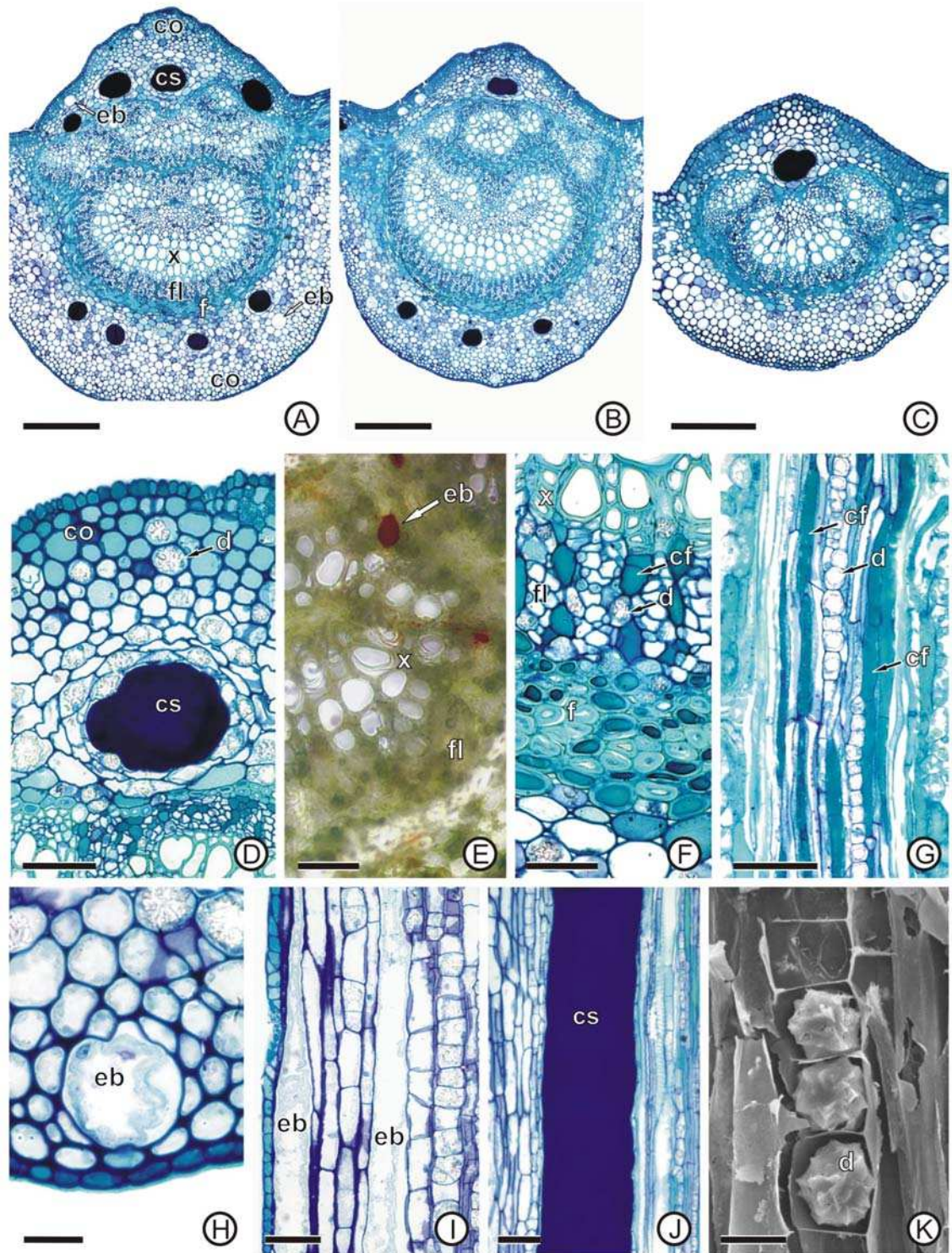


Figura 4. Nervura de primeira ordem de *Bixa orellana* em seção transversal (A-F, H) e longitudinal (G, I-K). A-C, aspecto geral da nervura primária mediana na região basal (A), mediana (B) e apical (C). D, detalhe da nervura na região mediana evidenciando canal secretor. E, detalhe da região vascular da nervura (material fresco) evidenciando estruturas secretoras de bixina. F-G, detalhes do feixe vascular evidenciando idioblastos com conteúdo fenólico. H-I, detalhes da nervura evidenciando estruturas secretoras de bixina. J, canal secretor. K, células contendo drusas (bainha cristalífera). Co, colênquima; cs, canal secretor; cf, célula com conteúdo fenólico; d, drusas; eb, estruturas secretoras de bixina; f, fibras; fl, floema; x, xilema. Barra: A, 150 μ m; B, C, 250 μ m; D, E, H, I, 50 μ m; E, 30 μ m; F, 40 μ m; G, 20 μ m; J, 10 μ m.

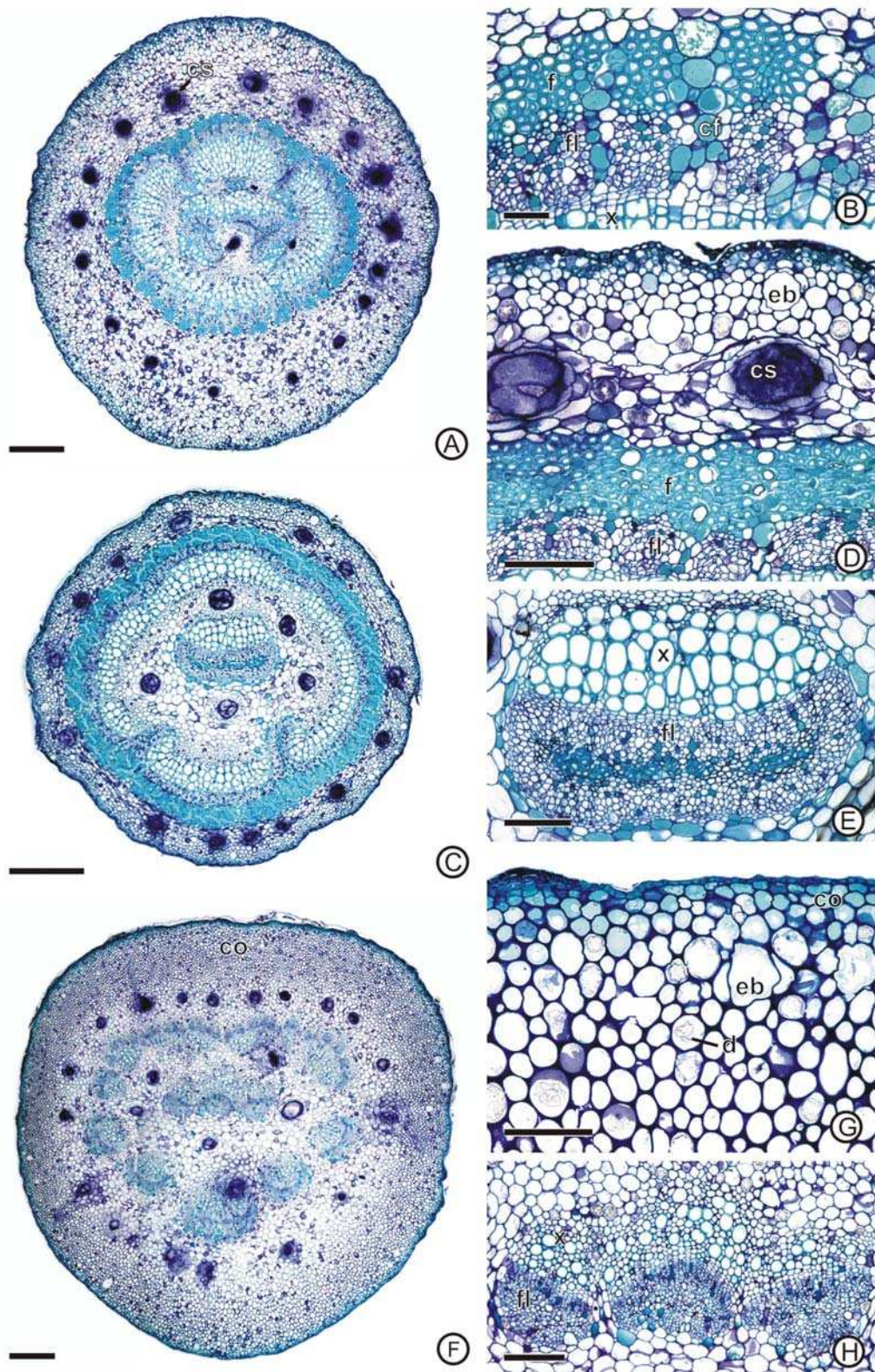


Figura 5. Pecíolo de *Bixa orellana* em seção transversal. **A, C, F**, aspecto geral nas três regiões: apical (**A**), mediana (**C**) e basal (**F**). **B**, detalhe de **A** na região vascular. **D-E**, detalhes da nervura na região mediana. **G-H**, detalhas da nervura na região basal. co, colênquima; cs, canal secretor; cf, célula com conteúdo fenólico; d, drusa; eb, estrutura secretora de bixina; f, fibras; fl, floema; fv, feixe vascular; x, xilema. Barra: **A, C, F**, 400 µm; **B**, 50 µm; **D, E, G**, 100 µm; **H**, 150 µm.

Discussão

Ambas as superfícies foliares de *B. orellana* são recobertas por tricomas peltados, semelhantes a escamas. Este tipo de tricoma peltado, com cabeça pluricelular em forma de disco achatado, pedicelo pluricelular e quatro células basais, já foi descrito por alguns autores para a família Bixaceae (METCALFE & CHALK, 1950; KEATING, 1970; CRONQUIST, 1981). Na família Cochlospermaceae, correlata de Bixaceae, os tricomas são simples e unicelulares, mas também podem ocorrer tricomas peltados no gênero *Cochlospermum* (METCALFE & CHALK, 1950). Keating (1970), entretanto, relata apenas a presença de tricomas unicelulares, não ramificados, tanto em *Amoreuxia* quanto em *Cochlospermum*, que não são persistentes na maioria das espécies. Nas folhas adultas de *B. orellana*, os tricomas escamiformes permanecem, em menor densidade que nos primórdios foliares.

Metcalf & Chalk (1950) descreveram a folha de *B. orellana* como hipoestomática, porém Keating (1970) observou estômatos em ambas as faces da folha, com maior abundância na face abaxial, como neste trabalho.

Ao lado das características epidérmicas, a organização do mesófilo, os tecidos vasculares e de sustentação da folha de *B. orellana* indicam que a espécie é mesofítica, pois as folhas não apresentam adaptações anatômicas marcantes associadas a ambientes xéricos ou demasiadamente úmidos e sombreados (DICKISON, 2000).

A presença de diferentes estruturas secretoras já foi registrada nas folhas e no caule de *B. orellana* (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981). O surgimento de certas estruturas especializadas e de algumas classes de metabólitos secundários, como resinas, óleos e taninos são consideradas adaptações à proteção de órgãos vegetais, tanto contra a herbivoria, quanto às condições ambientais adversas, como alta luminosidade e seca (FAHN, 1979; 1988; FAHN & CUTLER, 1992). A presença dessas estruturas secretoras em *B. orellana* pode indicar estratégias de defesa química.

As estruturas secretoras de bixina são denominadas de células secretoras por Kaur (1969) e de idioblastos ramificados por Keating (1970). Além de presentes no mesófilo e em porções corticais das nervuras de primeira ordem e pecíolo, estas estruturas secretoras de bixina também se encontram no floema, o que não foi relatado na literatura (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1950; KEATING, 1970). De acordo com a literatura, a produção e/ou acúmulo de bixina ocorre na testa das

sementes de *B. orellana* (KAUR, 1969; AMARAL et al., 2000; 2009), em estruturas secretoras semelhantes às encontradas na folha, porém, a função dessas estruturas pode ser diferente em partes vegetativas e reprodutivas.

Os canais secretores de *B. orellana*, que secretam apenas mucilagem, que é produto do metabolismo primário, provavelmente, estão relacionados com a adaptação ao ambiente, como o aporte de água para os tecidos, otimizando o balanço hídrico. Algumas funções específicas são relatadas para a existência de mucilagem nas plantas, mas a maioria converge para um ponto comum que é a proteção ao dessecamento (FAHN, 1979; 1988). Células com conteúdo rico em compostos fenólicos são encontradas em diferentes células e tecidos foliares, inclusive na epiderme, no córtex e associadas ao tecido vascular, o que pode indicar proteção contra herbivoria. Provavelmente, a biossíntese desses metabólitos esteja relacionada à utilização terapêutica da planta, visto que algumas de suas atividades biológicas já foram comprovadas (FLEISCHER et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007).

O pecíolo de *B. orellana* apresenta características distintas nas três regiões estudadas: basal, mediana e apical. As porções basal e apical são as mais alargadas do pecíolo, e principalmente a porção basal apresenta características típicas de pulvinos, já descritas para espécies de leguminosas (RODRIGUES & MACHADO, 2004; 2006). O pulvino é uma estrutura responsável por movimentos foliares e algumas características estruturais são reportadas na identificação dessa estrutura, como córtex amplo parenquimático, com substituição das fibras floemáticas por colênquima; sistema vascular em posição central e ausência ou redução de tecidos lignificados (RODRIGUES & MACHADO, 2004; 2006). A base do pecíolo de *B. orellana* se destaca pela grande quantidade de camadas de células do colênquima, amplo parênquima fundamental e ausência de tecido esclerificado, que são indícios estruturais de uma provável função motora na planta. Já a porção mediana do pecíolo apresenta uma grande quantidade de fibras o que foi destacado por Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950). Essas fibras devem auxiliar na sustentação do pecíolo que é relativamente longo. Uma característica peculiar do pecíolo é a presença de um feixe vascular colateral central, que pode servir como um caráter diagnóstico em *B. orellana*, visto que não ocorre nos gêneros *Amoreuxia* e *Cochlospermum* (Cochlospermaceae) (METCALFE & CHALK, 1950).

Idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio são abundantes em várias regiões da folha, ocorrendo isolados ou em grupos, como foi descrito por Metcalfe & Chalk (1950) nas folhas e caule jovem. Cristais de oxalato de cálcio são os

mais encontrados nos vegetais e têm como principais funções a regulação de cálcio, suporte mecânico dos tecidos, reflexão da luz e proteção contra herbivoria (FRANCESCHI & NAKATA, 2005). As drusas são as formas mais comuns entre as dicotiledôneas e ocorrem de forma solitária, agrupada, ou ambas, como em *B. orellana* (METCALFE & CHALK, 1989). O papel taxonômico dos cristais é bem indicado quando se trata da estrutura e distribuição dos diferentes tipos. Enquanto as drusas são frequentemente encontradas nas dicotiledôneas, as ráfides são mais comuns nas monocotiledôneas e a ocorrência de ambas, muitas vezes, é mutuamente exclusiva (PRYCHID & RUDALL, 1999). Dessa forma, é bem evidente a regulação genética da presença ou ausência dos diferentes tipos de cristais, o que justifica o seu emprego como um caráter taxonômico (FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Conclusões

A análise anatômica da folha de *B. orellana* indica que a espécie segue os padrões anatômicos gerais já relatados para a família Bixaceae, mas revela um maior detalhamento de dados, principalmente em relação à ocorrência e distribuição de estruturas secretoras.

Referências bibliográficas

- AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology** 42: 1687-1693, 2004.
- AGNER, A. R.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutation Research** 582: 146-154, 2005.

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17: 114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18: 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 89p.
- ALMASSY JÚNIOR, A. A.; LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: UFV, 2005. 233p.
- ALVES DE LIMA, R. O.; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology** 41: 189-192, 2003.
- AMARAL, L. I. V.; CORTELAZZO, A. L.; BUCKERIDGE, M. S.; PEREIRA, L. A. R.; PEREIRA, M. F. D. A. Anatomical and biochemical changes in the composition of developing seed coats of annatto (*Bixa orellana* L.). **Trees** 23: 287-293, 2009.
- AMARAL, L. I. V.; PEREIRA, M. F. D. A.; CORTELAZZO, A. L. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 273-285, 2000.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 111: 396-402, 2007.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. 540p.
- CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B. E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology** 48: 85-88, 1995.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.
- CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil: suas curiosidades históricas e lendas**. 1. ed. Belo Horizonte: [s.n.], 1965. 811p. v. 11.

- DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIMURA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989. 143p.
- DICKISON, W.C. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000. 533p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.
- FAHN, A. Transley review n 14: Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist** 108: 229-257, 1988.
- FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Berlim:Gebruder Borntraeger, 1992. 176p.
- FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia** 74: 136-138, 2003.
- FRANCESCHI, V. R., NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Plant Biology** 56: 41-71. 2005.
- HAKUNO, D. Materials. In.: PRANCE, G.; NESBITT, M. (Ed.) **The cultural history of plants**. New York: Routledge, 2005. cap. 17. p335-353.
- HICKEY, L. J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. (Ed.). **Anatomy of the dicotyledons**: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. p25-39. v. 1.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.
- KAUR, H. Embryological investigations on *Bixa orellana* L. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India** 35: 487-506, 1969.
- KEATING, R. C. Comparative morphology of the Cochlospermaceae. II. Anatomy of the Young vegetative shoot. **American Journal of Botany** 57: 889-898, 1970.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368p. v. 1.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MANTOVANI, N. C. **Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** 2007. 74f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950. 1500p. v. 2.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1988, 275p. v. 1.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: Wood structure and conclusion of the general introduction. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 297p. v. 2.
- MORAIS, S. M.; DANTAS, J. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 169-177, 2005.
- MOREIRA, R. C. T.; COSTA, L. C. B.; COSTA, R. C. S.; ROCHA, E. A. Abordagem entobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense** 21: 205-211, 2002.
- NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, S. L.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 37: 969-977, 2004.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. 412p.
- OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, S. L. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology** 73: 233-241, 2000.
- PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE-CARVALHO, R. R.; ARAÚJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology** 40: 1595-1601, 2002.
- PENNA, D. D.; POGSON, B. J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. **Annual Review of Plant Biology** 57: 711-738, 2006.
- PRANCE, G. T. **Algumas flores da Amazônia**. Manaus: INPA, 1976. 56p.

- PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. **Annals of Botany** 84: 725-739, 1999.
- RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 709-720, 2006.
- RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae - Faboideae). **Acta Botânica Brasílica** 18: 381-390. 2004.
- SCHERY, R. W. **Plants for man**. London: George Allen & Unwin, 1954.
- SOLEREDER, H. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press, 1908. 1182p. v. 2.
- STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I.; COSTA, M. G. C.; SOARES, V. L. F.; GESTEIRA, A.G.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C. Pigmentos do urucum – estrutura, química, biossíntese e degradação. p. 24-26. In: STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I. (Org.). **Pigmentos do urucum**: extração, reações químicas, usos e aplicações. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema, 2008. 166p.

CAPÍTULO 2

Estruturas secretoras em órgãos vegetativos de *Bixa orellana* L. (Bixaceae): distribuição, ontogenia e histoquímica

RESUMO – *Bixa orellana* L., (Bixaceae), conhecida como urucum ou colorau, produz um pigmento avermelhado nas sementes, utilizado como corante, especiaria e na medicina popular. Este trabalho teve por objetivos o estudo do desenvolvimento das estruturas secretoras de órgãos vegetativos de *B. orellana* e a análise histoquímica da secreção. Porções de ápices de parte aérea (estípulas, primórdios foliares e meristema), folhas, caule e raízes, em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, estocadas em etanol 70% e incluídas em metacrilato, seguindo processamento usual. Para a análise histoquímica, o material vegetal fresco foi seccionado em micrótomo de mesa e submetido a diversos corantes e reagentes. Para a caracterização micromorfológica, o material foi submetido às técnicas usuais de microscopia eletrônica de varredura. Tricomas peltados são abundantes nas estípulas e primórdios foliares e caulinares, mas tornam-se senescentes e esparsos em órgãos em expansão. A ontogenia dos tricomas peltados segue o padrão encontrado em tricomas secretores, mas a secreção (terpenos e flavonóides) fica acumulada nas células da cabeça, sem a formação de um espaço subcuticular típico. Estruturas secretoras de bixina originam-se do meristema fundamental em órgãos aéreos e, na raiz, de células corticais remanescentes durante o crescimento secundário. A origem e o desenvolvimento são pluricelulares, com incorporação gradativa de células que têm paredes comuns degradadas, formando uma estrutura pluricelular delimitada pelas paredes externas remanescentes, que progride com a formação de um espaço central, degradação de núcleos e acúmulo de secreção lipídica. Os canais, que secretam mucilagem e ocorrem apenas na parte aérea, originam-se no meristema fundamental e tem desenvolvimento lisígeno. Células taníferas ocorrem associadas ao tecido vascular em todos os órgãos vegetativos. Análises ultra-estruturais são necessárias para o esclarecimento de questões relacionadas ao desenvolvimento das estruturas secretoras de *B. orellana*, principalmente a confirmação da origem e desenvolvimento pluricelular das estruturas secretoras de bixina, o processo de síntese da bixina e a compartimentalização da secreção nos tricomas peltados.

Introdução

Bixa orellana L., conhecida como colorau ou urucum, nativa da América do Sul, é a espécie de maior destaque dentro da família Bixaceae, com sementes de testa avermelhada, utilizada como corante, especiaria e na medicina popular (PRANCE, 1976; LORENZI & MATOS, 2008). A presença de diferentes estruturas secretoras, como células e canais secretores, tricomas peltados e nectários extraflorais são relatados como caráter diagnóstico para a família Bixaceae (SOLEREDER, 1908; METCALFE & CHALK, 1950; 1988; 1989). Os trabalhos de ontogenia e histoquímica das estruturas secretoras em Bixaceae são escassos, inclusive em *B. orellana*, e há discordância em relação à classificação, tipo de secreção e distribuição nos diferentes órgãos. Também não se conhece a relação dessas estruturas secretoras com a síntese da bixina, principal apocarotenóide acumulado na testa das sementes de *B. orellana*.

A bixina é um apocarotenóide monometil éster di-carboxílico que confere a coloração vermelha às sementes de urucum (PENNA & POGSON, 2006). Já se demonstrou que na porção mais externa do tegumento das sementes estão localizadas as estruturas secretoras responsáveis pela síntese e/ou acúmulo de bixina (KAUR, 1969; JAKO et al., 2002). Além da presença nas sementes, a bixina é encontrada nos órgãos vegetativos dessa espécie, o que indicaria uma possível síntese dos carotenóides em sítios de secreção especializados dispostos por toda a planta (ORTIZ, 2004).

A presença de células secretoras em *B. orellana* é indicada no mesofilo e na região cortical do pecíolo e do caule (METCALFE & CHALK, 1950) e foram denominadas de idioblastos ramificados por Keating (1970). Apenas um estudo do desenvolvimento destes idioblastos é capaz de confirmar a origem dessas estruturas, visto que, pelo seu aspecto distinto, outras células podem estar envolvidas na sua formação. Solereder (1908) relata a presença de canais de mucilagem de origem lisígena no pecíolo e nervuras maiores das folhas, enquanto que no caule indica apenas um canal na medula, com posição central. Metcalfe & Chalk (1950), entretanto, citam que diversos canais secretores estão presentes na medula do caule e são delimitados por um epitélio de células pequenas, o que sugere desenvolvimento esquizógeno. Já as escamas são abundantes nas folhas e em porções caulinares mais jovens, e possuem base quadricelular, pedicelo curto e cabeça circular em forma de disco (METCALFE & CHALK, 1950).

Os metabólitos secundários encontrados nos vegetais são normalmente produzidos, armazenados e secretados por estruturas secretoras especializadas e estão relacionados com os usos medicinais e farmacológicos das espécies (FAHN, 1979; EVERT, 2006). Estudos de ontogenia podem auxiliar na identificação das fases de desenvolvimento das estruturas secretoras e na interpretação das estruturas já diferenciadas (ASCENSÃO & PAIS, 1987; CURTIS & LERSTEN, 1994; FAHN & SHIMONY, 1996; SILVA & MACHADO, 1999; CICCARELLI et al., 2001). Associados com outras áreas de conhecimento, como a histoquímica, a ontogenia pode auxiliar no esclarecimento dos possíveis locais de síntese e, ou acúmulo de secreção (PLATT & THOMSON, 1992; FAHN & SHIMONY, 1996; ASCENSÃO et al., 1997; 1999; BOTTEGA & CORSI, 2000; GERSBACH, 2002; KOLB & MÜLLER, 2004; COMBRINCK et al., 2007).

Apesar da importância econômica e das perspectivas de uso de *B. orellana*, ainda não se conhece a relação entre as estruturas secretoras e o provável local de síntese da bixina, nem como estas se originam e se desenvolvem nos órgãos vegetativos da planta. Dessa forma, o presente trabalho possui como objetivos o estudo do desenvolvimento das estruturas secretoras em órgãos vegetativos de *B. orellana* e a análise histoquímica da secreção.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram utilizadas plantas de *Bixa orellana* L., genótipo M1, que apresenta frutos avermelhados e alto teor de bixina (4,9%) (MANTOVANI, 2007), quando comparadas às outras variedades (M2-M10) que são cultivadas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, Minas Gerais. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), com a referência 31977.

Foram amostradas e analisadas porções de ápices de parte aérea, contendo estípulas, primórdios foliares e meristema, bem como folhas (região mediana do limbo e pecíolo), caules e raízes em diferentes fases de desenvolvimento.

Microscopia de luz

O material coletado foi fixado em glutaraldeído 2,5% (JOHANSEN, 1940), em tampão fosfato 0,05 M, por 24 horas, à temperatura ambiente, e estocado em etanol 70%. Amostras de aproximadamente 0,5 cm² foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permount).

Testes histoquímicos foram realizados com amostras frescas, seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo de mesa, ou com material incluído em metacrilato. Os corantes e reagentes usados foram: sudan III (JOHANSEN, 1940), sudan vermelho escarlata (BRUNDRETT et al., 1991), sudan black B (PEARSE, 1980) e vermelho neutro (KIRK, 1970) para lipídios; sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) para lipídios ácidos e neutros; reagente de NADI (DAVID & CARDE, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas; tricloreto de antimônio (HARDMAN & SOFOWORA, 1972; MACE et al., 1974) para esteróides; ácido sulfúrico (GEISSMAN & GRIFFIN, 1971) para lactonas sesquiterpênicas; 2,4-dinitrofenilhidrazina (GANter & JOLLÉS, 1969, 1970) para terpenóides com grupo carbonil; cloreto de ferro III (JOHANSEN, 1940) e dicromato de potássio (GABE, 1968) para compostos fenólicos; vanilina clorídrica (MACE & HOWELL, 1974) para taninos condensados; cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo (CHARRIÈRE-LADREIX, 1976) para flavonóides; floroglucina ácida (JENSEN, 1962) para ligninas; reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG, 1981) e reagente de Dittmar (FURR & MAHLBERG, 1981) para alcalóides; ácido periódico/ reagente de Schiff (PAS) (MAIA, 1979) para polissacarídeos neutros; reagente de lugol (JOHANSEN, 1940) para amido; vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940) e corifosfina (UEDA & YOSHIOKA, 1976) para substâncias pécticas e xylidine ponceau (VIDAL, 1977) para proteínas.

A observação e a obtenção de imagens foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-PHOTO, acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments Inc.) e a microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic. A análise com fluorocromos (cloreto de alumínio, acetato neutro de chumbo e corifosfina) e a

autofluorescência foram realizadas no mesmo equipamento, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 330-385 nm), espelho dicróico (400 nm) e filtro de barreira (420 nm), do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica das estruturas secretoras, amostras de aproximadamente 0,5 cm² do material vegetal foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Seguiram-se a desidratação em série etanólica e secagem em ponto crítico de CO₂ em aparelho adequado (modelo CPD 020, Bal-Tec). Após a fixação das amostras nos suportes com fita dupla-face, procedeu-se a deposição metálica com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec). A observação e a captura de imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Resultados

As gemas da parte aérea de *B. orellana* são formadas pelo promeristema, zona meristemática subjacente e primórdios foliares envoltos por estípulas (Figura 1A-F). As estípulas apresentam desenvolvimento precoce em relação aos primórdios foliares e porções caulinares correspondentes (Figura 1B). Nos primórdios foliares, a região do pecíolo e das nervuras de maior calibre diferencia-se precocemente em relação às regiões internervurais (Figura 1C-D).

Tricomas peltados, estruturas secretoras de bixina, canais secretores e células taníferas estão presentes em todos os órgãos vegetativos aéreos, e começam a se diferenciar em fases iniciais do desenvolvimento de estípulas, folhas e caules (Figura 1C-H). As raízes possuem apenas células taníferas e estruturas secretoras de bixina, que diferenciam-se tardiamente, durante o crescimento secundário do órgão.

Tricomas peltados - são formados por células basais, pedúnculo e cabeça pluricelulares, têm aspecto escamiforme e recobrem os órgãos vegetativos aéreos (Figura 2A-G). As estípulas são densamente recobertas pelos tricomas peltados na face

abaxial, mesmo quando se encontram totalmente expandidas (Figura 2A-B). Nos primórdios foliares e caulinares a densidade de tricomas peltados também é alta, mas diminui acentuadamente com a expansão de folhas e caules (Figura 2C-G).

A diferenciação dos tricomas antecede a diferenciação das estruturas secretoras internas e, nos primórdios foliares e caulinares, é escalonada, pois acompanha a expansão inicial do órgão. Num mesmo primórdio foliar ou caulinar podem ser observados tricomas peltados em diferentes estádios de desenvolvimento, desde as fases iniciais até a senescência (Figura 2C-E). Nas estípulas a diferenciação dos tricomas peltados é mais uniforme, sendo rara a observação de tricomas em estádios de desenvolvimento diferentes (Figura 2B).

Os tricomas peltados se originam de células protodérmicas que começam a se diferenciar das demais pela expansão da célula e pelo núcleo e nucléolo conspícuos (Figura 3A). Esta célula inicial apresenta o núcleo centralizado e aumenta de volume até sofrer as primeiras divisões anticliniais simétricas que formarão quatro células (Figura 3A-C). As células formadas se expandem radiamente para o exterior do órgão, com a polarização dos núcleos e nucléolos nesta região (Figura 3D). Seguem-se as primeiras divisões periclinais, gerando as células iniciais da cabeça e do pedúnculo (Figura 3E-F). Em seguida, ocorrem novas divisões periclinais que aumentam o número de células do pedicelo e novas divisões anticliniais que aumentam o número de células da cabeça (Figura 3G-H). As células da cabeça e do pedúnculo tornam-se vacuoladas e, a partir daí, inicia-se o acúmulo de secreção nas células da cabeça (Figura 3H-I). O acúmulo de compostos fenólicos nas células da cabeça pode ser observado pela coloração esverdeada com o azul de toluidina (Figura 3I). Pode-se observar mais de 40 células compondo a cabeça de um tricoma peltado completamente diferenciado (Figura 3J). Antes da completa expansão dos órgãos aéreos, os tricomas peltados já se encontram senescentes (Figura 3K), apresentando as células da cabeça colapsadas. Os tricomas peltados senescentes têm aspecto escamiforme e persistem em estípulas, folhas e caules diferenciados, embora se tornem muito esparsos com a expansão dos órgãos.

Estruturas secretoras de bixina – localizam-se entre os tecidos fundamentais de estípulas, folhas, caules e raízes, principalmente nas regiões corticais e, com menos frequência, associadas ao floema (Figura 4A-M).

Nos órgãos vegetativos aéreos (Figura 4A-J), originam-se a partir de células do meristema fundamental, próximas à protoderme e, também, dispostas entre cordões procambiais. Nas raízes (Figura 4K-M), as estruturas secretoras de bixina são formadas

apenas quando o órgão entra em crescimento secundário, porém, originam-se de células parenquimáticas corticais que permanecem e se proliferam durante o crescimento secundário da raiz (Figura 4K-M). Durante o crescimento secundário de nervuras, caules e raízes, estruturas secretoras de bixina também são formadas a partir de células-mãe do floema secundário.

As células iniciais distinguem-se das células adjacentes por apresentarem volume ligeiramente maior, núcleo e nucléolo conspícuos, citoplasma denso e vacuoma reduzido (Figura 5A). Algumas células iniciais dividem-se, mantendo núcleo e nucléolo conspícuos, mas as paredes celulares comuns degradam-se, enquanto as paredes externas permanecem íntegras e se tornam contínuas, formando uma estrutura polinucleada (Figura 5B). O desenvolvimento continua com a incorporação gradativa de células adjacentes, cujas paredes comuns degradam-se e o protoplasto é integrado à estrutura em formação, que ainda mantém conteúdo denso e inúmeros núcleos (Figura 5C-E). A expansão da estrutura secretora de bixina é mais evidente com o início da formação de um espaço central (Figura 5F-G). Nos estádios finais do desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina os núcleos são degradados e o espaço central atinge seu tamanho máximo e, provavelmente, já acumula secreção, enquanto as células adjacentes ainda estão em diferenciação (Figura 5H). A estrutura secretora de bixina totalmente diferenciada é formada por um espaço central ocupado pela secreção, delimitado pelas paredes celulares externas remanescentes de células que se incorporam.

As estruturas secretoras de bixina são arredondadas e alongadas axialmente (pecíolos, nervuras primárias, caules e raízes), e apenas nas regiões internervurais do limbo apresentam algumas projeções brachiformes (Figura 5I-L).

Canais secretores - nas estípulas, os canais secretores ocorrem entre os feixes vasculares (Figura 6A); na lâmina foliar, ocorrem na região cortical de nervuras de maior calibre (Figura 6B), enquanto no pecíolo (Figura 6C, G) e no caule (Figura 6D), também ocorrem na região medular. No caule, é comum a presença de amiloplastos nas células que delimitam os canais (Figura 6E-F).

Os canais secretores originam-se e se tornam diferenciados mais tardiamente que as estruturas secretoras de bixina. Originam-se no meristema fundamental, próximos aos cordões procambiais, em estípulas, folhas e caules (Figura 1), estando ausentes no sistema radicular.

A célula inicial que dará origem ao canal secretor se distingue pelo tamanho ligeiramente maior que as células adjacentes e núcleo e nucléolos conspícuos, porém, é a partir da primeira divisão celular que a distinção é mais evidente (Figura 7A-B). Seguem-se divisões periclinais e, posteriormente, anticlinais, gerando um complexo de células recém divididas, pequenas, com núcleo e nucléolos conspícuos, semelhante a um meristemóide (Figura 7C-E). Células localizadas ao redor deste meristemóide sofrem divisões anticlinais e periclinais (Figura 7D-E), formando novas camadas concêntricas de células achatadas. Ocorre a degradação das paredes (Figura 7F-G) e, posteriormente, dos protoplastos (Figura 7H-J) das células iniciais centrais. A formação do lume inicia-se com o acúmulo de material mucilaginoso no centro da estrutura (Figura 7H-J), o que pode ser observado pela coloração arroxeada com o azul de toluidina. A proliferação das camadas de células achatadas continua, à medida que as camadas mais internas também sofrem degradação e se incorporam à secreção mucilaginosa, proporcionando a expansão do lume do canal (Figura 7K). Finalmente, o canal encontra-se repleto de mucilagem, com uma a duas camadas de células parenquimáticas achatadas delimitando o canal (Figura 7L).

Células taníferas ou idioblastos taníferos – ocorrem em todos os órgãos vegetativos, associadas ao tecido vascular, principalmente o floema, durante o crescimento primário e secundário dos órgãos (Figura 8A-B), com exceção da raiz, onde as células taníferas são encontradas apenas associadas ao tecido vascular secundário (Figura 8C). As células taníferas são semelhantes às células parenquimáticas dos tecidos vasculares onde ocorrem, mas destacam-se pela coloração verde intensa após coloração com azul de toluidina e pelo alongamento axial (Figura 8D-F). Embora ocorram outras células com conteúdo fenólico nos órgãos vegetativos, também coradas pelo azul de toluidina, estas apresentam localização cortical e não contêm taninos.

Caracterização histoquímica - Em todos os órgãos analisados de *B. orellana*, como estípulas, folhas, caules e raízes, as estruturas secretoras obtiveram reações semelhantes aos testes histoquímicos aplicados. Os resultados encontram-se reunidos na tabela 1 e figura 9.

Os tricomas peltados apresentam-se translúcidos a amarelados em material fresco (*in vivo*) (Figura 9A). Os compostos fenólicos constituem o grupo químico mais evidente na secreção dos tricomas, confirmado pela coloração castanha com o teste do dicromato de potássio (Figura 9B) e também pela coloração negra com o cloreto férrico

e esverdeada com o azul de toluidina. Em luz ultravioleta, a presença de flavonóides é indicada pela intensa fluorescência amarela-esverdeada emitida pela ação do fluorocromo cloreto de alumínio (Figura 9C). Lipídios também estão presentes nos tricomas, identificados pela coloração negra após o teste com sudan black B e pela fluorescência secundária amarela de gotículas presentes nas células da cabeça, com a utilização do vermelho neutro (Figura 9D). Quando os tricomas peltados são observados em luz UV, sem nenhum tratamento prévio, apenas a cutícula apresenta autofluorescência amarelo-esverdeada (Figura 9E). O reagente de Nadi indica a presença de óleos essenciais, corados de azul, nas células da cabeça e em algumas células do pedicelo que se encontram em contato direto com a cabeça secretora (Figura 9F).

As estruturas secretoras de bixina apresentam secreção oleosa de coloração vermelho-alaranjada em material vegetal fresco (estípulas, folhas, caules e raízes) não submetido a nenhum tipo de corante ou reagente (Figura 9G). O principal grupo químico identificado nestas estruturas foi o dos lipídios, evidenciados pela coloração negra após o teste com sudan black B (Figura 9H). Todos os demais testes histoquímicos propostos na metodologia foram realizados, mas devido à dificuldade de observação do resultado pela coloração avermelhada natural da secreção, não foi possível a confirmação do resultado, pois a reação positiva de alguns testes coincide ou é mascarada pela coloração natural da secreção.

Os canais secretores apresentam secreção translúcida em material fresco (*in vivo*) (Figura 9I). A presença de pectinas que compõem a mucilagem é confirmada pela coloração rosa intensa com o vermelho de rutênio (Figura 9J) e pela coloração arroxeadada com o azul de toluidina. A composição mucilagínosa dos canais secretores foi confirmada pela corifosfina, em luz ultravioleta, apresentando fluorescência secundária amarelo-alaranjada, típica para substâncias pécticas (Figura 9K).

Células com conteúdo fenólico foram identificadas com dicromato de potássio (Figura 9L) e cloreto férrico, na região cortical nervuras primárias, pecíolo e caule, e também em células associadas ao tecido vascular em todos os órgãos analisados. Apenas as células associadas ao tecido vascular em estípulas, folhas, caules e raízes apresentaram tanino, como indica o teste com vanilina clorídrica (Figura 9M-N).

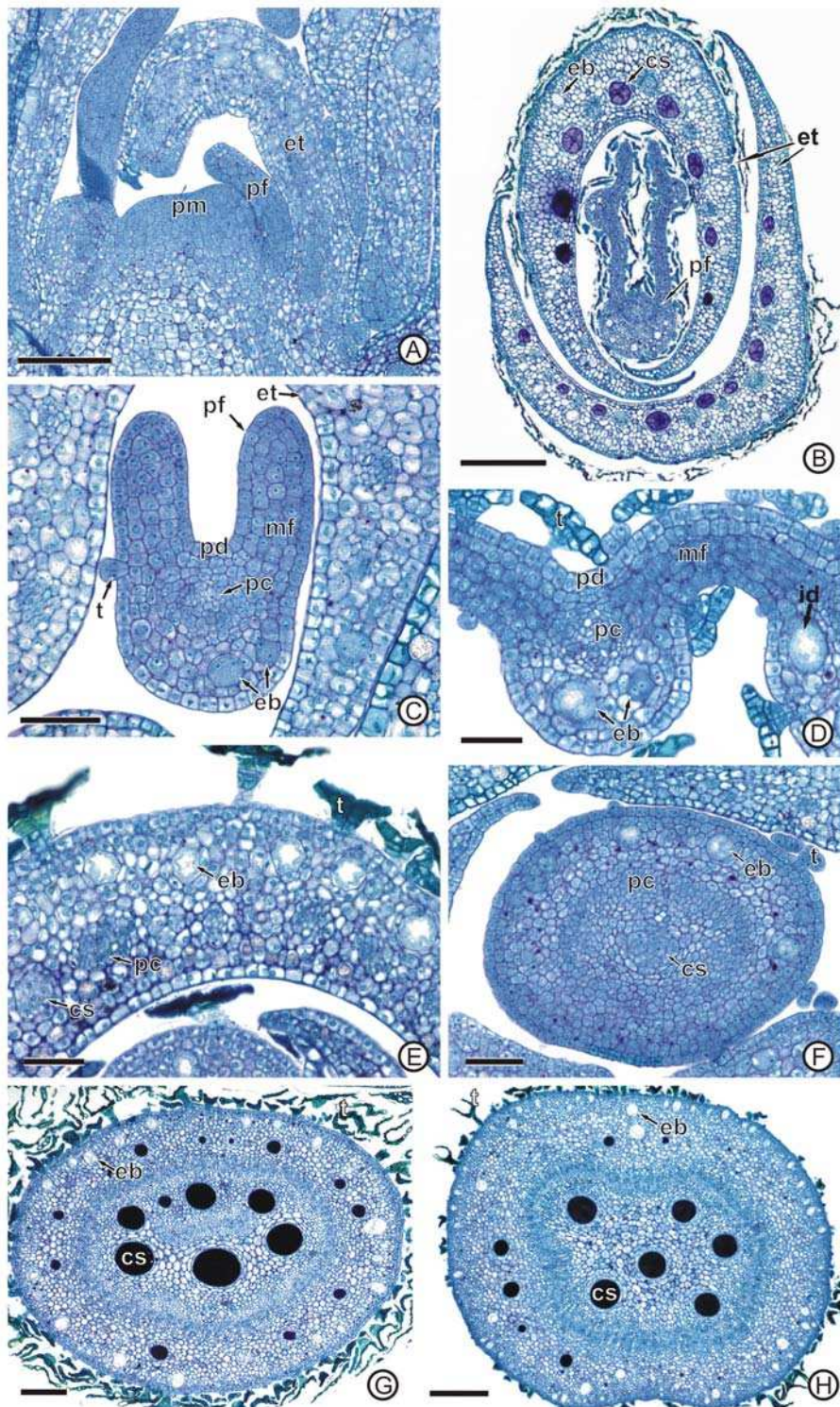


Figura 1. Ápices de parte aérea de *Bixa orellana* em seção longitudinal (A) e transversal (B-H). **A**, meristema apical de parte aérea. **B-C**, primórdios foliares envolvidos por estípulas. **D**, detalhe de primórdio foliar. **E**, detalhe de estípula. **F**, pecíolo em fase meristemática. **G-H**, canais secretores já diferenciados em pecíolo (G) e caule (H). Cs, canal secretor; eb, estrutura secretoras de bixina; et, estípula; mf, meristema fundamental; pf, primórdio foliar; pd, protoderme; pm, promeristema; t, tricoma. Barra: A, 50 μm ; F, H, 100 μm ; B, 250 μm ; C, 300 μm ; D, G, 40 μm ; E, 200 μm .

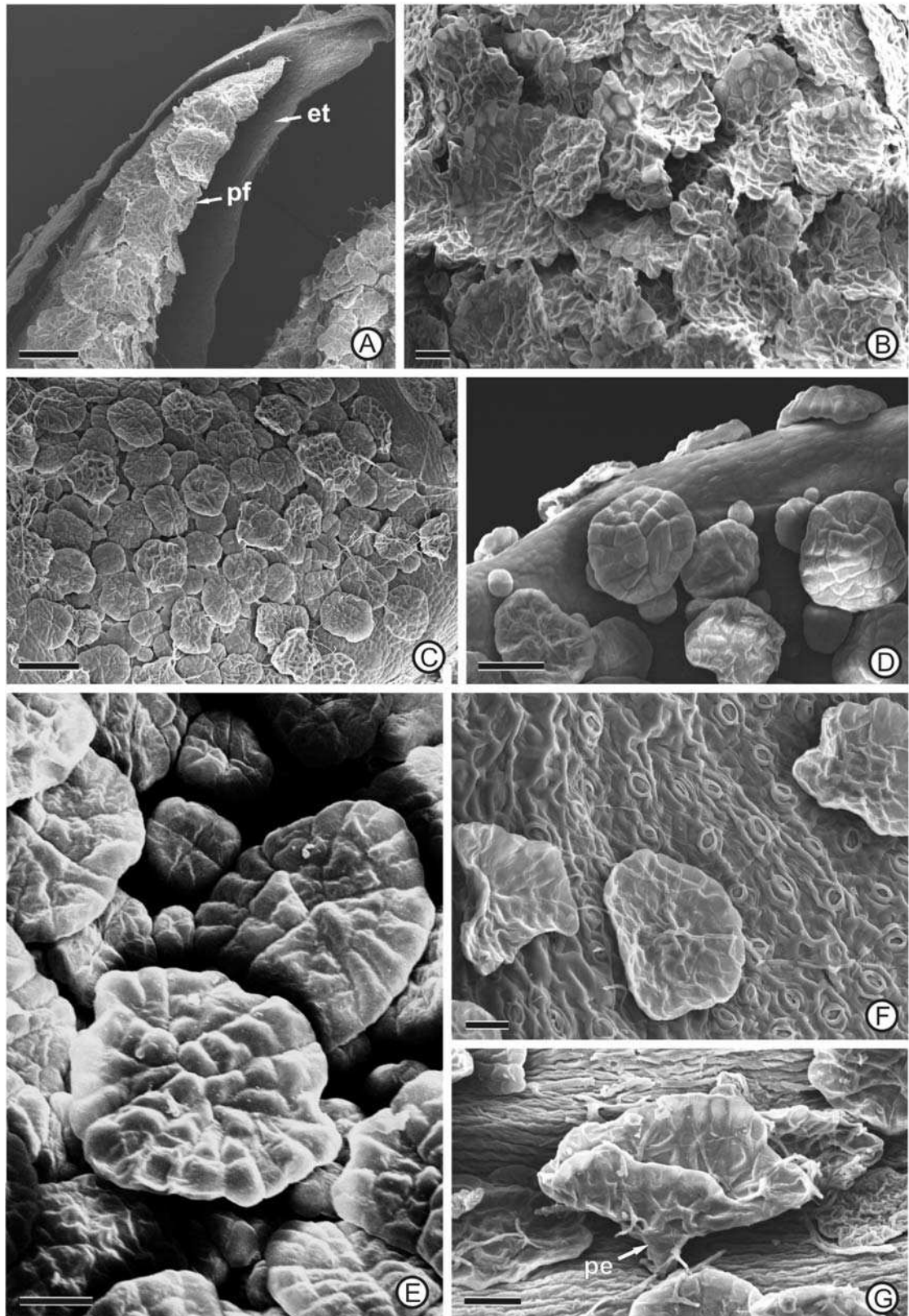


Figura 2. Distribuição de tricomas peltados em órgãos vegetativos aéreos de *B. orellana*. **A**, aspecto geral de ápice de parte aérea. **B**, detalhe da face abaxial da estípula. **C-E**, detalhes de tricomas peltados em diferentes fases de desenvolvimento em primórdios foliares. **F-G**, tricomas peltados senescentes na superfície de folhas completamente expandidas (F) e de caules (G). et, estípula; pe, pedicelo; pf, primórdio foliar. Barra: A, C, 100 μm ; B, 30 μm ; D, 40 μm ; E, F 20 μm ; G, 25 μm .

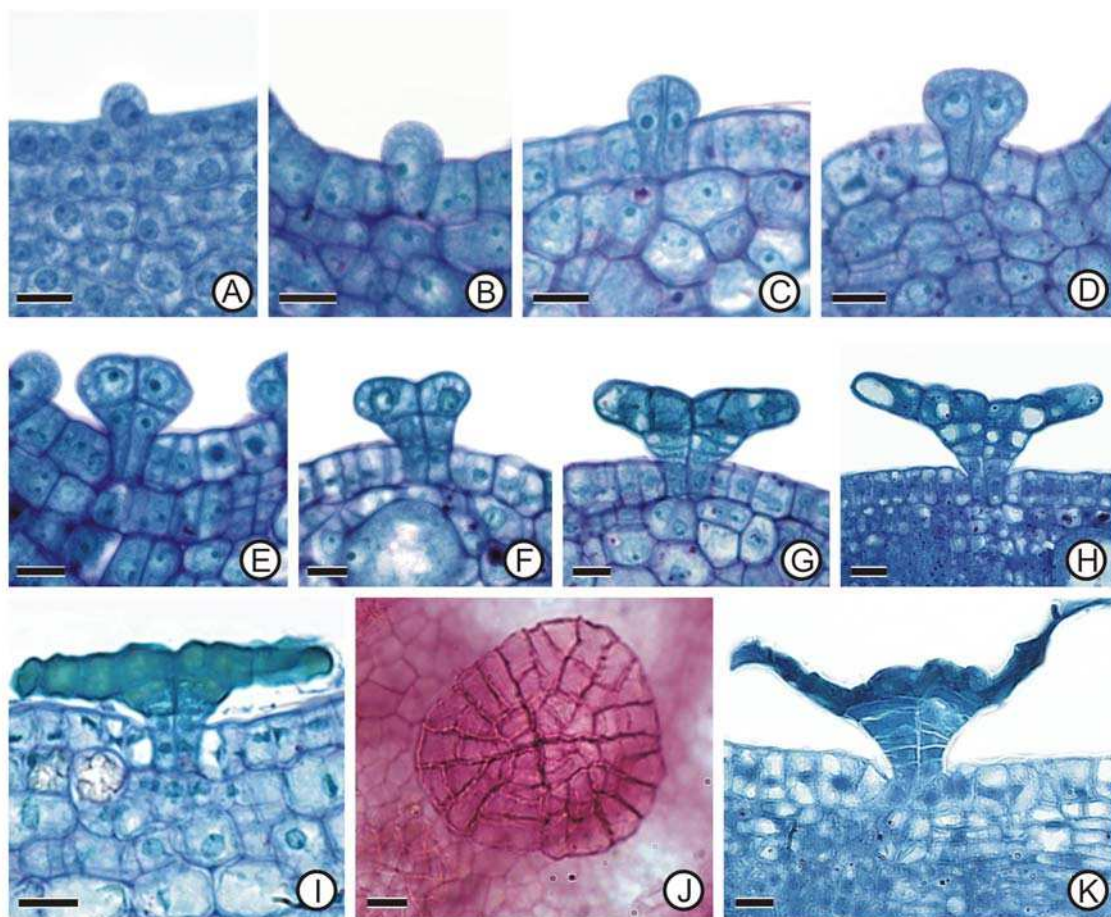


Figura 3. Tricomas peltados de *B. orellana* em diferentes fases de desenvolvimento, em seção transversal (A-J) e paradérmica (K). **A**, célula inicial com núcleo e nucléolo conspícuos. **B**, célula inicial mais expandida com núcleo migrando para a porção superior da célula. **C**, primeira divisão anticlinal. **D**, aumento de volume da porção superior das células. **E-F**, divisões periclinais originando as células iniciais da cabeça, pedicelo e base. **G-H**, expansão do tricoma pelo aumento do número de células da cabeça e do pedicelo. **I**, tricoma completamente diferenciado; células da cabeça com conteúdo fenólico, indicado pela coloração verde com o azul de toluidina. **J**, detalhe da cabeça do tricoma, com mais de 40 células. **K**, tricoma senescente, escamiforme. Barra: 10 μ m.

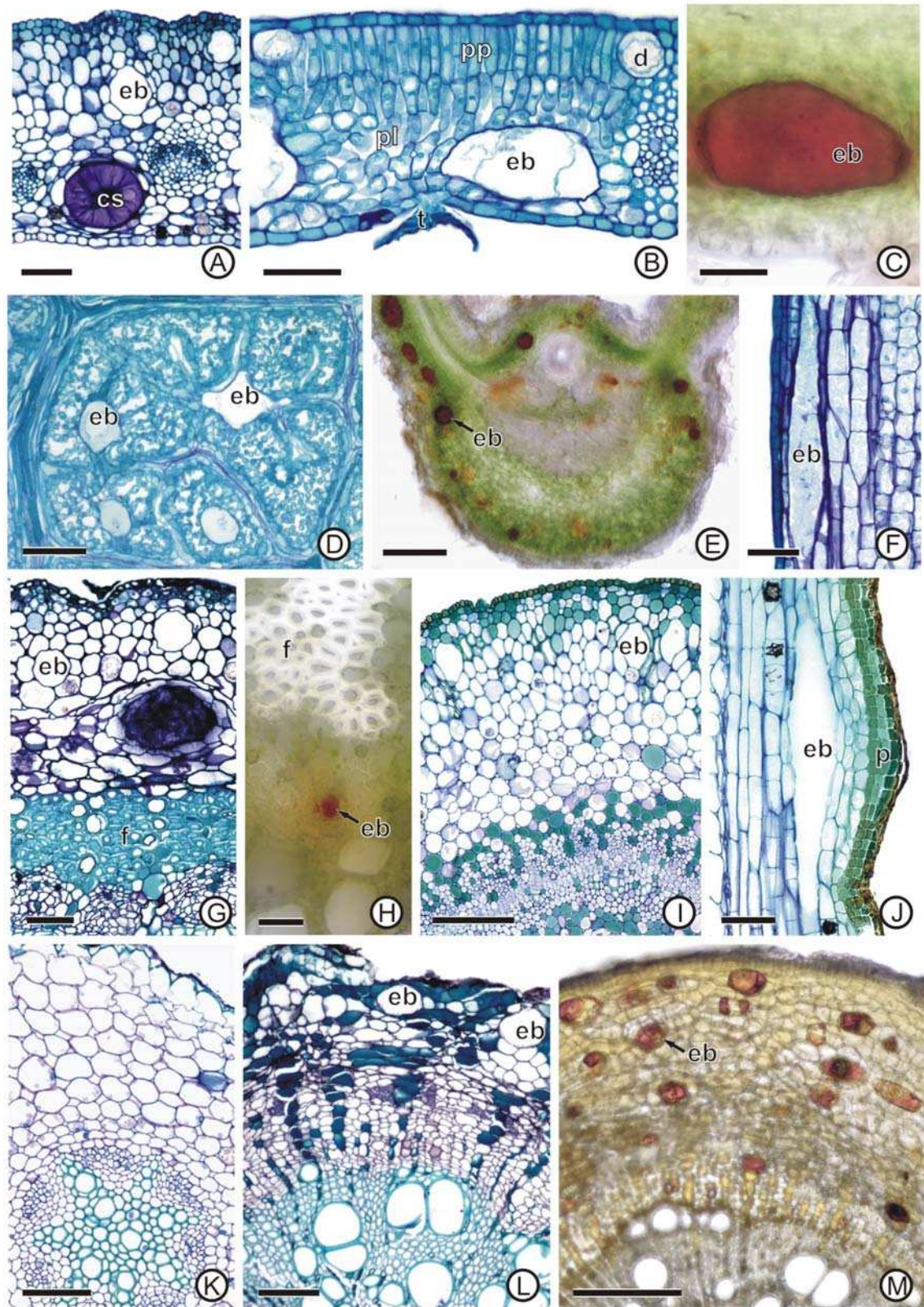


Figura 4. Distribuição de estruturas secretoras de bixina em órgãos vegetativos de *Bixa orellana*, em seção transversal (A-C, E, G-I, K-M), paradérmica (D) e longitudinal (F, J). A, estípula. B-H, folha. C, E, H, material fresco. I-J, caule. K, raiz em crescimento primário. L-M, raiz em crescimento secundário. M, material fresco. Cs, canal secretor; d, drusa; eb, estrutura secretora de bixina, f, fibras; fl, floema; p, periderme; pl, parênquima lacunoso; pp, parênquima paliádico; t, tricoma peltado. Barra: A, F, G, J, 50 μ m; B, 40 μ m; C, 20 μ m; D, E, I, K, L 100 μ m; H, 25 μ m; M, 200 μ m.

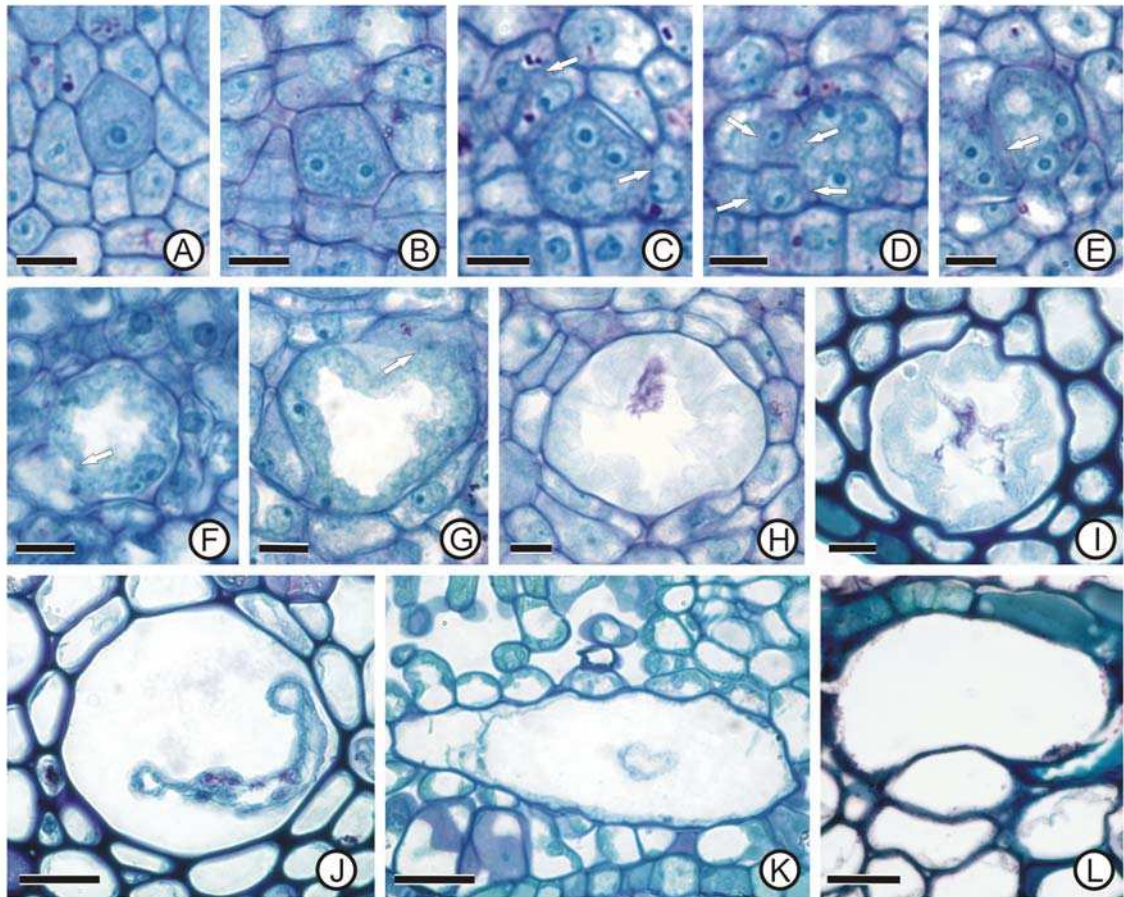


Figura 5. Estruturas secretoras de bixina de *Bixa orellana* em diferentes fases de desenvolvimento, em seção transversal. **A**, célula inicial com citoplasma denso, núcleo e nucléolo conspícuos. **B-G**, expansão da estrutura secretora pela fusão de células adjacentes que também apresentam núcleo e nucléolo conspícuos, formando uma estrutura polinucleada. Em C-G pode-se notar a degradação de paredes celulares (setas) na formação da estrutura secretora. F-I, pode-se observar o início da formação de uma área central translúcida e do acúmulo de material citoplasmático nas porções parietais. H-I, núcleos já estão degradados e há aumento da área central. **J-L**, estruturas secretoras de bixina completamente diferenciadas nas nervuras (J), mesofilo (K) e córtex da raiz(L). Barra: A-I, 10 µm; J-L, 20 µm.

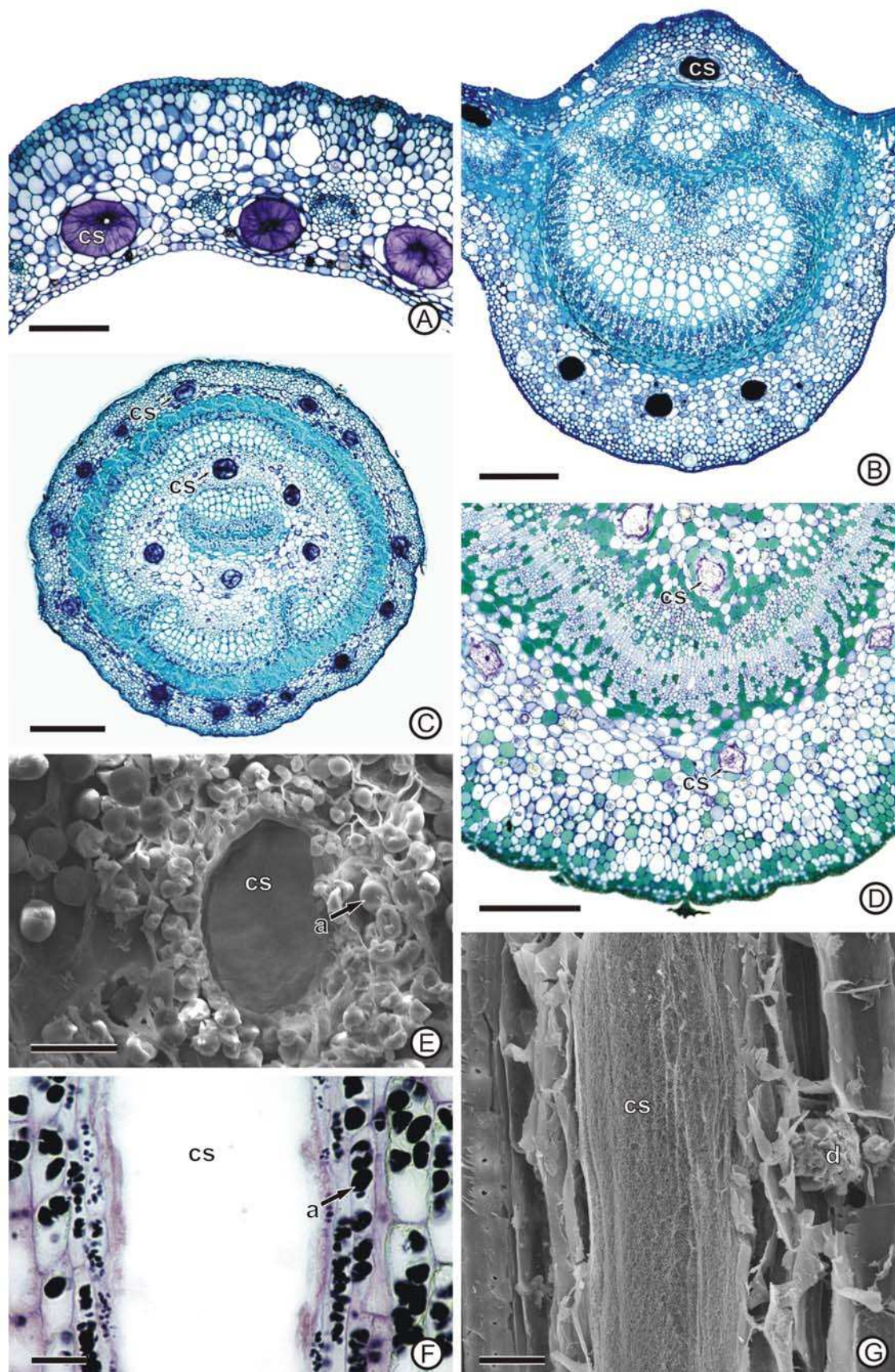


Figura 6. Distribuição de canais secretores em órgãos vegetativos de *Bixa orellana*, em seção transversal (A-E) e longitudinal (F-G). A, estípula. B, nervura primária. C, G, pecíolo. D-F, caule. A, amiloplasto, cs, canal secretor; d, drusa. Barra: A, 100 μ m; B, D 200 μ m; C, 400 μ m; E, 30 μ m; F, 50 μ m; G, 20 μ m.

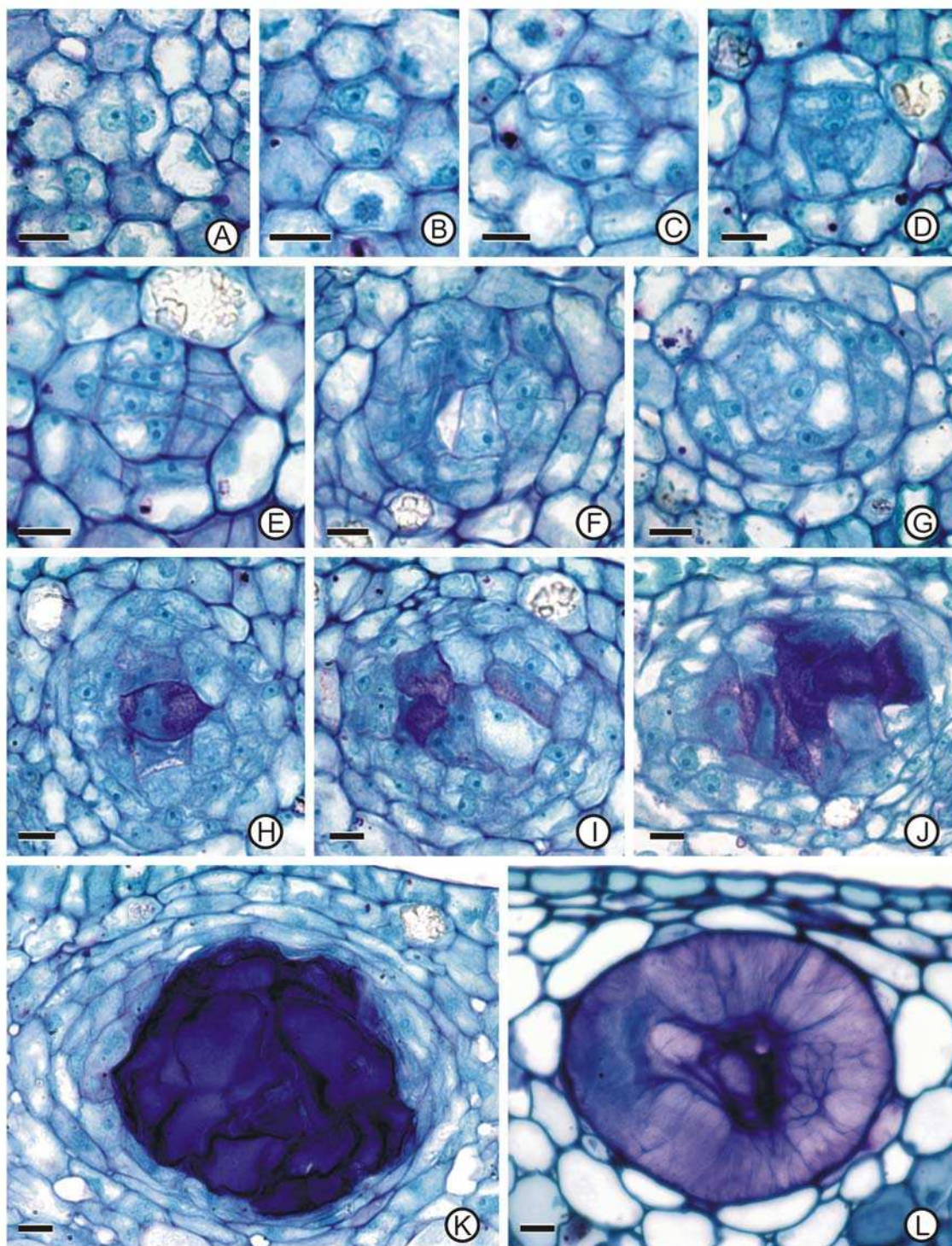


Figura 7. Canais secretores de *Bixa orellana* em diferentes fases de desenvolvimento, em seção transversal. **A-B**, células iniciais após a primeira divisão celular. **C-E** sucessivas divisões anticlinais e periclinais das células centrais do canal, com arranjo concêntrico. **F-G**, as paredes das células centrais do canal começam a se degradar. **H-J**, início da formação do lume do canal pelo acúmulo de mucilagem (coloração arroxeada) a partir da degradação de paredes e protoplastos das células centrais. **K**, expansão do lume pela lise de células adjacentes achatadas e com disposição concêntrica. **L**, canal completamente diferenciado com lume repleto de mucilagem. Barra: 10 μm .

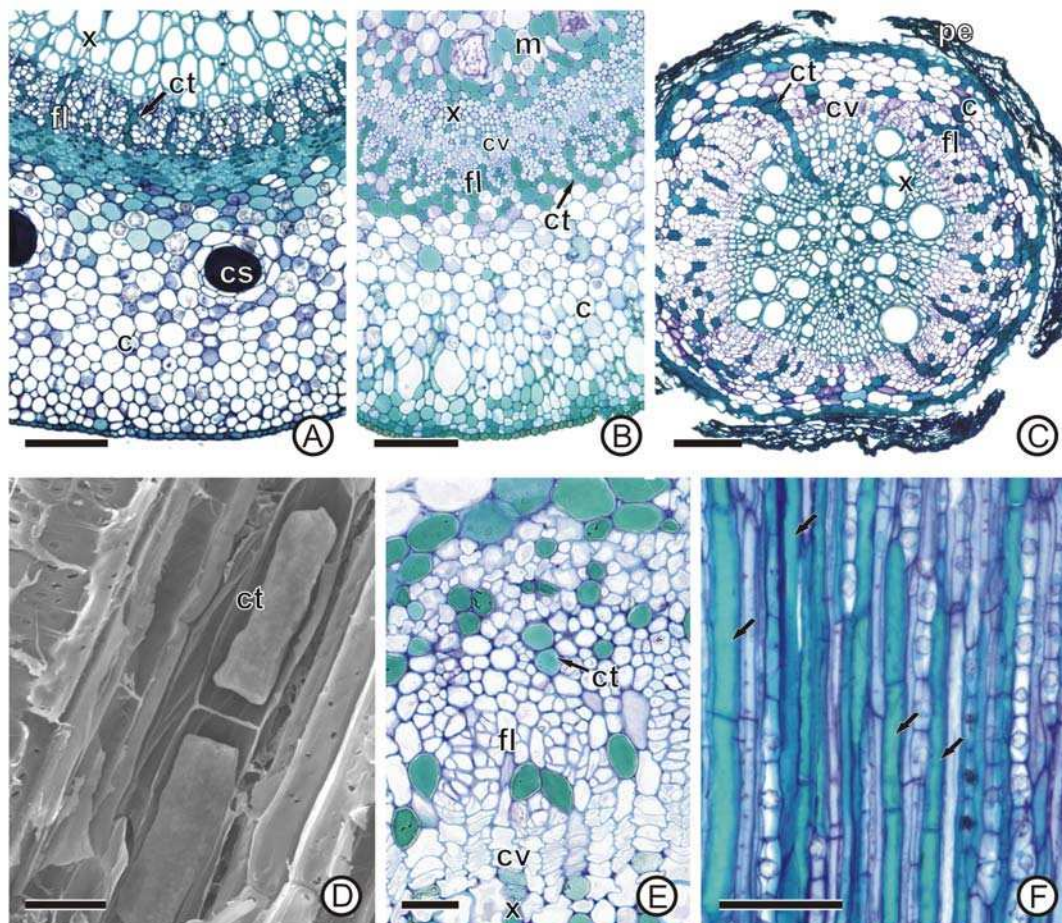


Figura 8. Células taníferas em órgãos vegetativos de *Bixa orellana*, em seção transversal (A-C, E) e longitudinal (C, F). **A**, nervura primária. **B**, caule. **C**, raiz. **D**, detalhe do pecíolo, evidenciando o enfileiramento das células taníferas. **E-F**, detalhes do caule na região vascular. Em F, setas indicam células taníferas. fl, floema; c, córtex; cs, canal secretor; ct, célula tanífera; cv, câmbio vascular; m, medula; pe, periderme; x, xilema. Barra: A-C, 100 μm ; D, I, 20 μm ; E, 25 μm .

Tabela 1. Testes histoquímicos em órgãos vegetativos de *Bixa orellana*.

Reagente/corante	Compostos	Tricoma peltado	Estrutura secretora de bixina	Canal secretor	Células com conteúdo fenólico	
					C/M	Fl
LIPÍDIOS						
Sudan (III e vermelho escarlate)	Lipídios	-	-	-	-	-
Sudan black B	Lipídios	+	+	-	-	-
Vermelho neutro	Lipídios	+	-	-	-	-
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos e neutros	-	-	-	-	-
Reagente de Nadi	Óleos essenciais e oleorresinas	+	-	-	-	-
Tricloreto de antimônio	Esteróides	-	-	-	-	-
Ácido sulfúrico	Lactonas sesquiterpênicas	-	-	-	-	-
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenóides	-	-	-	-	-
COMPOSTOS FENÓLICOS						
Cloreto de ferro III	Compostos fenólicos	+	-	-	+	+
Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	+	-	-	+	+
Cloreto de alumínio	Flavonóides	+	-	-	-	-
Vanilina clorídrica	Taninos	-	-	-	-	+
Floroglucina	Lignina	-	-	-	-	-
ALCALÓIDES						
Reagente de Wagner	Alcalóide	-	-	-	-	-
Reagente de Dittmar	Alcalóide	-	-	-	-	-
CARBOIDRATOS						
Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS)	Polissacarídeos	-	-	+	-	-
Vermelho de Rutênio	Pectinas	-	-	+	-	-
Corifosfina	Pectinas	-	-	+	-	-
Reagente de Lugol	Amido	-	-	-	-	-
PROTEÍNAS						
Xylidine ponceau (XP)	Proteínas	-	-	-	-	-

C/M, região cortical ou medular; Fl, região do floema.

+ presença; - ausência

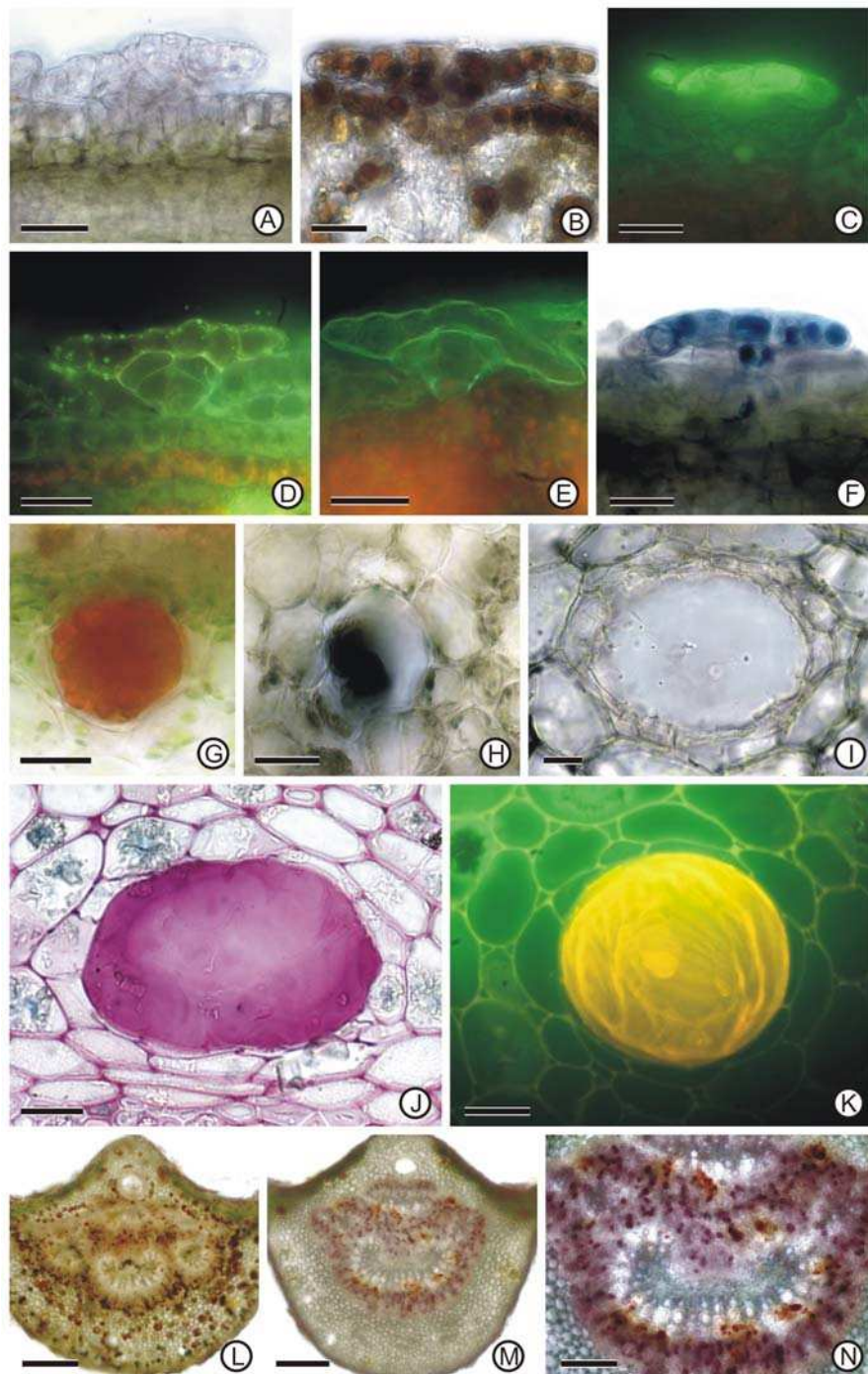


Figura 9. Testes histoquímicos realizados em órgãos vegetativos de *B. orellana*. **A-F**, tricomas peltados. **A**, material fresco. **B**, dicromato de potássio; a coloração marrom indica a presença de compostos fenólicos. **C**, cloreto de alumínio; a fluorescência secundária amarelo-esverdeada, sob luz UV, indica a presença de flavonóides. **D**, vermelho neutro; a fluorescência secundária amarela, sob luz UV, indica a presença de lipídios. **E**, autofluorescência em luz UV. **F**, reagente de NADI; a coloração azul indica a presença de terpenos. **G-H**, estruturas secretoras de bixina. **G**, material fresco. Notar a secreção vermelho-alaranjada. **H**, sudan black B; coloração negra indica a presença de lipídio. **I-K**, canal secretor. **I**, material fresco. **J**, vermelho de rutênio; coloração rosada indica a presença de pectina. **K**, corifosfina; a fluorescência secundária alaranjada, sob luz UV, indica a presença de pectina. **L-N**, células com conteúdo fenólico (nervura primária). **L**, dicromato de potássio; a coloração marrom indica a presença de compostos fenólicos. **M-N**, vanilina clorídrica; a coloração avermelhada indica a presença de taninos. Barra: A-K, 20 μ m; L-M, 200 μ m; N, 100 μ m.

Discussão

A maioria das estruturas e células envolvidas na síntese de metabólitos secundários encontrados nos órgãos vegetativos de *Bixa orellana* encontram-se na parte aérea, como tricomas peltados, estruturas secretoras de bixina, canais secretores e células taníferas. Nas raízes, apenas estruturas secretoras de bixina e células taníferas são encontradas, provavelmente pela menor pressão de seleção em sistemas subterrâneos durante o processo evolutivo (GIFFORD & FOSTER, 1988).

Os tricomas peltados de *B. orellana* recobrem densamente os primórdios foliares, caulinares e estípulas, apresentando diferenciação precoce em relação aos órgãos onde se encontram e permanecem, ainda que senescentes e em baixa densidade, nos órgãos completamente desenvolvidos. Essa situação é relativamente comum em diversas espécies, uma vez que meristemas e órgãos em desenvolvimento são frágeis e, portanto, proteção mecânica e química, seriam dadas por tricomas tectores e diversas estruturas secretoras, respectivamente (FAHN, 1979; EVERT, 2006). Sem dúvida, os tricomas peltados de *B. orellana* têm função mecânica como os tricomas tectores encontrados em ápices vegetativos de diferentes espécies, porém, a presença de secreção (terpenos e flavonóides) nas células da cabeça também sustenta a hipótese de contribuírem com a defesa química.

A ontogenia dos tricomas peltados de *B. orellana* segue padrões semelhantes aos encontrados em tricomas secretores de diversas espécies (ASCENSÃO & PAIS, 1987; ASCENSÃO et al., 1997, 1999; TURNER et al., 2000; MONTEIRO et al., 2001), salvo pela falta de um espaço subcuticular conspícuo onde ocorre acúmulo de secreção. O acúmulo de compostos fenólicos (flavonóides) e gotículas lipídicas (terpenos), no final do processo de diferenciação, indicam a função secretora das células da cabeça do tricoma, embora a compartimentalização da secreção só seja esclarecida com estudos de microscopia eletrônica de transmissão. A presença de terpenos e compostos fenólicos é comum em tricomas secretores e relatada em uma série de estudos (SERRATO-VALENTI et al., 1997; BOSABALIDIS et al., 1998; ASCENSÃO et al., 1999; HEIRINCH et al., 2002; VENTRELLA & MARINHO, 2008). Os flavonóides destacam-se por suas funções fotoprotetora, antimicrobiana e anti-herbivoria (TATTINI et al., 2000; POURCEL et al., 2006), enquanto os terpenos teriam, pelo menos, função anti-herbivoria (HARBORNE, 1975).

As estruturas secretoras de bixina analisadas neste trabalho têm origem e desenvolvimento pluricelular, ou seja, um pequeno grupo de células dividem-se e suas paredes comuns são degradadas, dando origem a uma estrutura inicialmente plurinucleada. Com o desenvolvimento, os núcleos migram para a periferia da célula e degeneram, coincidindo com a formação de um grande espaço central e acúmulo de pigmento. Tanto pela origem quanto pelo desenvolvimento, as estruturas secretoras de bixina diferem de idioblastos e de cavidades secretoras (ver EVERT, 2006), embora se assemelhem com ambos quando estão completamente diferenciadas.

As estruturas secretoras de bixina de *B. orellana* são descritas na literatura como células secretoras (METCALFE & CHALK, 1957), células de bixina (CORNER, 1976), células de pigmento (KAUR, 1969) e idioblastos ramificados (KEATING, 1970), o que sugere a classificação dessas estruturas como idioblastos. Apenas Kaur (1969) descreve a ontogenia das “células” de bixina a partir do tegumento externo do óvulo. Segundo este autor, ocorre multiplicação de núcleos e aumento do número de vacúolos de uma única célula inicial, seguida da coalescência de vacúolos, migração de núcleos para a camada periférica de citoplasma, degeneração de núcleos e fusão de vacúolos, culminando com o acúmulo de pigmento na célula. Porém, idioblastos ou células secretoras têm, necessariamente, origem e desenvolvimento unicelulares, além de conteúdo, tamanho e função diferentes das células adjacentes (FAHN, 1979; EVERT, 2006). Deve-se considerar que a análise de Kaur (1969) é feita em microscopia de luz e não apresenta fotomicrografias de etapas chave do processo de ontogênese, e o representa apenas com ilustrações. Isso impede que se tenha idéia da qualidade do material após o processamento, que a metodologia descreve de forma pouco clara, mas sugere que seja com fixação em FAA e inclusão em parafina. Já o presente estudo utiliza glutaraldeído 2,5% como fixador e inclusão em metacrilato, propiciando melhor preservação da estrutura celular e seções mais finas. As estruturas secretoras de bixina podem ser consideradas incomuns, quando o processo ontogenético é comparado ao de outras estruturas secretoras, além de acumularem pigmentos, que raramente ocorrem em estruturas especializadas. Embora estudos ultra-estruturais sejam necessários para confirmar o processo de desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina, propõem-se, neste trabalho, não adotar os termos idioblasto ou célula secretora, mas apenas “estrutura secretora de bixina”, por se tratar de uma estrutura secretora com desenvolvimento distinto.

Apenas a natureza lipídica da secreção foi confirmada pelos testes histoquímicos utilizados neste trabalho, porém, além da bixina, outros compostos lipídicos, incluindo óleos essenciais e carotenóides já foram encontrados no urucum, como geranil geraniol, fitoeno, limoneno, farnesil acetona, ishwarano e norbixina (BARBOSA-FILHO et al., 1997; PINO & CORREA, 2003).

Os canais secretores de *B. orellana* têm origem no meristema fundamental, a partir de uma célula que se divide continuamente até formar um meristemóide, seguida de autólise das células centrais e formação de lume repleto de mucilagem, o que é confirmado pelos testes histoquímicos. Portanto, o desenvolvimento dos canais secretores de *B. orellana* é lisígeno, como já foi apontado para os canais de mucilagem de *Cochlospermum vitifolium*, espécie correlata à *B. orellana* (KEATING, 1970). Outros estudos também relatam a lisigenia em canais de goma, canais resiníferos e cavidades (JOEL & FAHN, 1980; BOSABALIDIS & TSEKOS, 1982; VENKAIAH & SHAH, 1984; LERSTEN, 1986; KALACHANIS & PSARAS, 2005). Investigações ultra-estruturais revelam que vesículas do complexo de Golgi, repletas de polissacarídeos, se fundem com a membrana plasmática e depositam o conteúdo fora do protoplasto. A mucilagem é então acumulada entre a membrana plasmática e a parede celular da célula secretora. Quando se tornam cheias de mucilagem, a parede celular, bem como o protoplasto dessas células se degeneram, descarregando o conteúdo celular no lume do canal em formação (FAHN, 1979; MAUSETH, 1988). Algumas funções específicas são relatadas para a existência de mucilagem nas plantas, mas a maioria converge para um ponto comum que é a proteção ao dessecamento (FAHN 1979; 1988). Metcalfe & Chalk (1989) registram a presença de canais de mucilagem em 21 famílias, incluindo Bixaceae, Cactaceae, Fabaceae, Malvaceae e Sterculiaceae.

Células epidérmicas, células parenquimáticas do córtex e da medula de órgãos vegetativos de *B. orellana* podem acumular compostos fenólicos durante o desenvolvimento, porém não diferem das células adjacentes em formato e não reagem positivamente para taninos com o teste da vanilina clorídrica. No entanto, as células com conteúdo fenólico associadas aos tecidos vasculares são mais alongadas e enfileiradas axialmente, e reagem positivamente para taninos, podendo ser denominadas de idioblastos taníferos. Células contendo compostos fenólicos, como os idioblastos taníferos, são comuns em espécies vegetais, e formam sistemas conectados que normalmente estão associadas ao sistema vascular (EVERT, 2006), como ocorre em laticíferos. A delimitação de algumas estruturas secretoras como os laticíferos é bastante controversa, havendo uma gama de estruturas intermediárias entre uma simples célula

parenquimática que contém látex até o elaborado sistema laticífero, que também podem conter taninos, mucilagem, proteínas e outros compostos (EVERT, 2006).

Os taninos, assim como os compostos fenólicos em geral, são reconhecidos por sua função protetora na planta, principalmente contra a herbivoria, devido o seu sabor adstringente (LEVIN, 1973). A defesa química do vegetal está relacionada com a secreção de metabólitos secundários em estruturas secretoras distintas, principalmente em órgãos em desenvolvimento, mas que podem acumular a secreção até a senescência do órgão, como no caso das estruturas secretoras internas de *B. orellana*, como canais secretores, estruturas secretoras de bixina e idioblastos taníferos.

Conclusões

Embora a origem e o desenvolvimento de estruturas secretoras de *B. orellana* seja precoce em relação ao desenvolvimento do órgão onde ocorrem, a secreção se mantém acumulada nas estruturas secretoras internas até a completa expansão dos órgãos, garantindo defesa química à planta em diferentes estádios de desenvolvimento.

A maior abundância de estruturas secretoras de *B. orellana* na parte aérea ocorre, provavelmente, devido à maior pressão de seleção na parte aérea, onde as variações ambientais e o acesso a microorganismos e herbívoros são maiores. A variedade de metabólitos primários e secundários encontrados em estruturas secretoras sugere a adaptação da espécie em relação ao ambiente e aos organismos com que interagem e, provavelmente, relaciona-se com atividades antibacteriana, antifúngica, antidiarréica e antiofídica já registradas para a espécie.

Análises ultra-estruturais são necessárias para o esclarecimento de questões cruciais do desenvolvimento das estruturas secretoras de *B. orellana*, principalmente a confirmação da origem e desenvolvimento pluricelular das estruturas secretoras de bixina, o processo de síntese da bixina e a compartimentalização da secreção nos tricomas peltados.

Referências Bibliográficas

- ASCENSÃO, L.; MARQUES, N.; PAIS, M. S. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. **International Journal of Plant Sciences** 158: 249-258, 1997.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. M. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. **Annals of Botany** 84: 437-447, 1999.
- ASCENSÃO, L.; PAIS, M. S. S. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. **Botanical Gazette** 148: 221-227, 1987.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA-FILHO, R. N.; LIRA, B. F.; MACÊDO, R. O.; SILVA, M. S.; CHAVES, M. C. O.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 7/8: 41-47, 1997.
- BOSABALIDIS, A.; TSEKOS, I. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. **Protoplasma** 112: 55-62, 1982.
- BOSABALIDIS, A.; GABRIELI, C.; NIOPAS, J. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens*. **Phytochemistry** 49(6):1549-1553, 1998.
- BOTTEGA, S.; CORSI, G. Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 132: 325-335, 2000.
- BRUNDRETT, M. C.; KENDRICK, B.; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. **Biotechnic & Histochemistry** 66: 111-116, 1991.
- CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. **Quarterly Journal of Microscopical Science** 88: 383-392, 1947.
- CHARRIÈRE-LADRIEX, Y. Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta** 129: 167-174, 1976.
- CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A. C.; PAGNI, A. M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. **Annals of Botany** 88: 637-644, 2001.

- COMBRINCK, S.; DU PLOOY, G. W.; MCCRINDLE, R. I.; MCCRINDLE, B. M. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany** 99: 1111-1119, 2007.
- CORNER, E. J. H. The seeds of dicotyledon. Cambridge: Cambridge University Press. 2v. 1976.
- CURTIS, J. D.; LERSTEN, N. R. Developmental anatomy of internal cavities of epidermal origin in leaves of *Polygonum* (Polygonaceae). **The New Phytologist** 127: 761-770, 1994.
- DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**, série D258: 1338-1340, 1964.
- EVERT, R. F. **Esau's Plant Anatomy**: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3. ed. New Jersey: Wiley Interscience, 2006. 601p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.
- FAHN, A. Transley review n 14: Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist** 108: 229-257, 1988.
- FAHN, A.; SHIMONY, C. Glandular trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials. **Annals of Botany** 77: 25-34, 1996.
- FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** 44: 153-159, 1981.
- GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie, 1968.
- GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histologie normale et pathologique**. Paris: Gauthier-Villars, 1969, 1970. v. I e II.
- GEISSMAN, T. A.; GRIFFIN, T. S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. **Phytochemistry** 10: 2475-2485, 1971.
- GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany** 89: 255-206, 2002.
- GIFFORD, E.M.; FOSTER, A.S. **Morfology and evolution of vascular plants**. New York: W. H. Freeman and Company, 1988. 626p.

- HARBORNE, J. B. Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and related families. **Phytochemistry** 14(5-6): 1331-1337, 1975.
- HARDMAN, R.; SOFOWORA, E. A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technology** 47: 205-208, 1972.
- HEIRINCH, G.; PFEIFHOFER, H. W.; STANBENTHEINER, E.; SAWIDIS, T. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): Morphology, Histochemistry and composition of essential oil. **Annals of Botany** 89: 459-469, 2002.
- JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D. W.; PELCHER, L. E.; COVELLO, P. S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science** 163: 141-145, 2002.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1962. 408p.
- JOEL, D. M.; FAHN, A. Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 1. Differentiation and senescence of the shoot ducts. **Annals of Botany** 46: 225-233, 1980.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.
- KALACHANIS, D.; PSARAS, G. K. Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. **Biologia Plantarum** 49: 105-110, 2005.
- KAUR, H. Embryological investigations on *Bixa orellana* L. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India** 35: 487-506, 1969.
- KEATING, R. C. Comparative morphology of the Cochlospermaceae. II. Anatomy of the Young vegetative shoot. **American Journal of Botany** 57: 889-898, 1970.
- KIRK, P. W. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology** 45: 1-4, 1970.
- KOLB, D.; MÜLLER, M. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Curcubita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. **Annals of Botany** 94: 515-526, 2004.
- LERSTEN, N. R. Re-investigation of secretory cavity development in *Lysimachia* (Primulaceae). **The New Phytologist** 102: 193-197, 1986.

- LEVIN, D. A. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology** 48: 3-14, 1973.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathology** 64: 1297-1302, 1974.
- MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** 52: 2423-2426, 1974.
- MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo: Atheneu, 1979. 298p.
- MANTOVANI, N. C. **Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** Tese de Doutorado. Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy**. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1988. 560p.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950. 1500p. v. 1.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1988. 276p. v. 1.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: Wood structure and conclusion of the general introduction**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 297p. v. 2.
- MONTEIRO, W. R.; CASTRO, M. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C.; MAHLBERG, P. G. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica** 24(3): 349-357, 2001.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373, 1964.
- ORTÍZ, C. E. R. **Avaliação fisiológica de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese de Doutorado. Viçosa, Minas Gerais, 2004.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. 4. ed. Longman Group Limited, 1980. v. 2.

- PENNA, D. D.; POGSON, B. J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. **Annual Review of Plant Biology** 57: 711-738, 2006.
- PINO, J. A.; CORREA, M. T. Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Journal of Essential Oil Research** 15: 66-67, 2003.
- PLATT, K. A.; THOMSON, W. W. Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry and biochemistry. **International Journal of Plant Sciences** 153: 301-310, 1992.
- POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science** 12(1): 29-36, 2006.
- PRANCE, G. T. **Algumas flores da Amazônia**. Manaus: INPA, 1976. 56p.
- SERRATO-VALENTI, G.; BISIO, A.; CORNARA, L.; CIARALLO, G. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. **Annals of Botany** 79: 329-336, 1997.
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 22: 117-124, 1999.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press, 1908. 1182p. v.2.
- TATTINI, M.; GRAVANO, E.; PINELLI, P.; MULINACCI, N.; ROMANI, A. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. **New Phytologist** 148: 69-77, 2000.
- TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Development of peltate glandular trichomes of Peppermint. **Plant Physiology** 124: 665-679, 2000.
- UEDA, K.; YOSHIOKA, S. Cell wall development of *Micrasteria americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. **Journal of Cell Science** 21: 617-631, 1976.
- VENKAIAH, K.; SHAH, J. J. Distribution, development and structure of gum ducts in *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merril. **Annals of Botany** 54: 175-186, 1984.
- VENTRELLA, M. C.; MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica** 31(3): 457-467, 2008.
- VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular Biology** 22: 45-64, 1977.

CONCLUSÕES FINAIS

A análise anatômica da folha de *B. orellana* indica que a espécie segue os padrões anatômicos gerais já relatados para a família Bixaceae, mas revela um maior detalhamento de dados, principalmente em relação à ocorrência e distribuição de estruturas secretoras.

A relação funcional das diferentes estruturas secretoras de *B. orellana* com o ambiente e com os organismos associados ainda deve ser testada.

As estruturas secretoras de bixina podem ser consideradas incomuns, quando o processo ontogenético é comparado ao de outras estruturas secretoras, além de acumularem pigmentos, que raramente ocorrem em estruturas especializadas.

A realização de estudos ultra-estruturais é imprescindível para o esclarecimento de questões importantes do desenvolvimento das estruturas secretoras de *B. orellana*, principalmente a confirmação da origem e desenvolvimento pluricelular das estruturas secretoras de bixina, o processo de síntese da bixina e a compartimentalização da secreção nos tricomas peltados.