

CARMEN EUGENIA RODRÍGUEZ ORTÍZ

AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE URUCUM

(*Bixa orellana* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2004

CARMEN EUGENIA RODRÍGUEZ ORTÍZ

AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE URUCUM

(Bixa orellana L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de Setembro de 2004

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Conselheiro)

Prof. Aloisio Xavier
(Conselheiro)

Prof. Marco Antonio Oliva Cano

Prof. Vespasiano Borges de Paiva Neto

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por conceder-me a oportunidade de realizar o Curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudos.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), ao Laboratório de Anatomia Vegetal, à Unidade de Crescimento de Plantas e Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia, pela infra-estrutura disponibilizada para a condução da pesquisa.

Ao professor Wagner Campos Otoni pela orientação, pelo diálogo aberto e permanente apoio.

Aos professores Marco Antonio Oliva Cano, Sérgio Y.. Motoike, Aloisio Xavier e Vespasiano Borges de Paiva Neto pelas críticas, sugestões e aconselhamentos.

Ao Sr. Marcos Munuera, da Christian-Hansen do Brasil, pelas amostras de bixina e norbixina e ao professor Paulo César. Stringheta, pelo auxílio na determinação da bixina.

À professora Marília Ventrella, pela ajuda durante meu trabalho de Anatomia.

Ao professor Raimundo Santos Barros, pelos ensinamentos e convívio caloroso.

Ao professor Eldo Antonio Monteiro da Silva pela sua energia, perseverança e Amor e dedicação à Anatomia.

Ao professor Nicolau Priante Filho, da UFMT, pelo auxílio nas análises estatísticas, pela amizade, incentivo e exemplo de desprendimento e dedicação às pessoas.

A todos os meus professores e professoras com quem, desde o primário, tive a oportunidade de aprender e de crescer como profissional e como pessoa.

A todos os amigos, colegas e técnicos que comigo compartilharam de risos, de angústias, de pensamentos, do trabalho e de conhecimentos, especialmente Alan Carlos Costa, Danilo C. Centeno, Leandro G. Neves e Nilton Mantovani.

Aos meus pais, Mary e Benjamin, meus primeiros Mestres e aos meus irmãos Mauricio e Juan Diego, pelo Amor que nos une, exemplo e constante estímulo, sempre perto do meu coração, ainda que distantes.

Ao meu esposo Francisco e a minha filha Mariana, pelo seu Amor e paciência.

BIOGRAFIA

Carmen Eugenia Rodríguez Ortíz, filha de Benjamin Rodríguez e Mary Ortíz de Rodríguez, nasceu em Barrancabermeja, Colômbia. Graduou-se em Biologia em 1985 pela Pontificia Universidad Javeriana, em Bogotá, Colômbia. Trabalhou como assistente de pesquisa em projetos desenvolvidos na área de cultura de tecidos, na Unidade de Biologia Vegetal do Departamento de Biologia da mesma Universidade entre 1985 a 1989. Realizou seu Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, recebendo o título de *Magister Scientiae* em 1992, regressando à Colômbia nesse ano, onde assumiu o cargo de professor investigador no Departamento de Biologia da Facultad de Ciências da Pontificia Universidad Javeriana, até Julho de 1997. Regressou ao Brasil onde desempenhou o cargo de professor visitante do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso, entre Agosto de 1997 a Agosto de 1999. Posteriormente, iniciou o Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Março de 2000.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Comparação do potencial fotossintético de dois grupos de plantas de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	1
Resumo	1
Palavras-chaves	2
Introdução	3
Material e Métodos	5
<i>Material Vegetal e Condições de Cultivo</i>	5
<i>Medições da Taxa Fotossintética Líquida</i>	5
<i>Modelo Não-Linear de Resposta da Fotossíntese à Luz</i>	6
<i>Modelo Não-Linear de Resposta da Fotossíntese à Concentração Intracelular de CO₂</i>	7
<i>Estimativa da Limitação Estomática à Fotossíntese</i>	8
<i>Delineamento Experimental e Análises Estatísticas</i>	9
Resultados e Discussão	10
Conclusões	20
Referências Bibliográficas	22
CAPÍTULO II – Avaliação do grau de associação entre o teor dos pigmentos cloroplastídicos, a capacidade fotossintética e o teor de bixina das sementes em dois grupos de plantas de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	24
Resumo	24
Palavras-chaves	24
Introdução	25
Material e Métodos	26
<i>Material Vegetal, Condições de Cultivo e Determinação das Variáveis Relacionadas com as Curvas de Resposta da Fotossíntese Líquida à Luz e à Concentração Intercelular de CO₂</i>	26
<i>Determinação dos Teores de Pigmentos Cloroplastídicos</i>	26
<i>Determinação do Teor de Bixina nas Sementes</i>	27
<i>Delineamento Experimental e Análises Estatísticas</i>	28
Resultados e Discussão	29

Conclusões	35
Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO III – Caracterização de idioblastos e detecção de bixina em folhas de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.).....	38
Resumo	38
Palavras-chaves	38
Introdução	39
Material e Métodos	41
<i>Material Vegetal</i>	<i>41</i>
<i>Estudos Anatômicos</i>	<i>41</i>
<i>Obtenção dos Extratos Foliares</i>	<i>42</i>
<i>Cromatografia em Camada Fina</i>	<i>42</i>
Resultados e Discussão	43
<i>Anatomia Foliar</i>	<i>43</i>
<i>Análise Cromatográfica</i>	<i>46</i>
Conclusões	50
Referências Bibliográficas	51
CAPÍTULO IV – Efeitos de diferentes densidades de fluxo de luz sobre os teores de pigmentos cloroplastídicos, a fluorescência e a atividade de enzimas do estresse foto-oxidativo em ápices caulinares de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.) cultivados <i>in vitro</i>	54
Resumo	54
Palavras-chaves	54
Introdução	55
Material e Métodos	57
<i>Material Vegetal</i>	<i>57</i>
<i>Condições de Cultivo</i>	<i>57</i>
<i>Análise dos Pigmentos Cloroplastídicos</i>	<i>57</i>
<i>Atividade Enzimática</i>	<i>59</i>
<i>Análise da Foto-Inibição</i>	<i>60</i>
<i>Delineamento Experimental e Análises Estatísticas</i>	<i>60</i>
Resultados e Discussão	62
<i>Teste do Efeito da Zeatina sobre os Explantes</i>	<i>62</i>

<i>Efeito de Diferentes Densidades de Fluxo de Luz sobre os Pigmentos Cloroplastídicos</i>	68
<i>Atividade Enzimática de Explantes Submetidos a Diferentes Densidades de Fluxo de Luz</i>	72
<i>Avaliação do Estresse Foto-Oxidativo</i>	78
Conclusões	83
Referências Bibliográficas	84
CONCLUSÕES GERAIS	88

RESUMO

RODRÍGUEZ ORTÍZ, Carmen Eugenia, D.S. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2004. **Avaliação fisiológica de plantas de Urucum (*Bixa orellana* L).** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Aloisio Xavier e Sérgio Yoshimitsu Motoike.

O presente trabalho teve por objetivos: (a) analisar a capacidade fotossintética de dois grupos de material vegetal sob condições de campo: plantas adultas com frutos verdes pilosos e plantas com frutos avermelhados pilosos; (b) avaliar o desenvolvimento de explantes cultivados *in vitro* submetidos a diferentes densidades de fluxo de luz; e (c) estudo anatômico de folhas de plantas adultas e *in vitro*. As hipóteses testadas foram: (a) existem diferenças na capacidade fotossintética entre os dois grupos de planta analisados; (b) alguns dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e ao CO₂ devem estar correlacionados com os teores dos pigmentos cloroplastídicos; (c) os carotenóides totais presentes nas folhas de Urucum podem desempenhar papel foto-protetor ao estresse foto-oxidativo, possibilitando que explantes cultivados *in vitro* possam se desenvolver a altas densidades de fluxo de luz. Verificou-se que ambos os grupos de plantas não apresentaram diferenças estatísticas significativas em seus parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e ao CO₂. Assim sendo, para estes grupos foram encontrados os valores médios seguintes: 19,17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima, 22,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o ponto de compensação de luz, 1274 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o ponto de saturação de luz, 15,38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima, 63,0 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para o ponto de compensação de CO₂ e 0,1403 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a eficiência carboxilativa da Rubisco. Foram observadas as seguintes correlações lineares: entre a eficiência quântica máxima e a irradiância de saturação ($r = -0,7794$; $P = 0,0176$), entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a irradiância de saturação ($r = 0,8780$; $P = 0,0018$), entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,6242$; $P = 0,0408$), entre a eficiência carboxilativa e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,8208$; $P = 0,0067$), entre a limitação estomática à fotossíntese e a concentração intercelular de

CO₂ para uma concentração ambiental de 400 μmol mol⁻¹ ($r = -0,8927$; $P = 0,0012$), entre a eficiência quântica e o teor de clorofila *a* ($r = -0,8887$; $P = 0,0014$), clorofila *b* ($r = -0,8505$; $P = 0,0037$) e clorofilas totais ($r = -0,9033$; $P = 0,0008$) e entre a limitação estomática à fotossíntese e o ponto de compensação de luz ($r = -0,6751$; $P = 0,0460$). Verificou-se que ambos grupos não diferiram entre si nos teores de pigmentos cloroplastídicos, com uma média de 1629,6 mg kg⁻¹ de clorofila *a*, 643,4 mg kg⁻¹ de clorofila *b* e 2272,9 mg kg⁻¹ de carotenóides totais; também não houve diferença estatística entre os teores de bixina nas sementes das plantas de ambos os grupos, com um valor médio de 4,42% que as classificam como boas produtoras do corante. Os teores de bixina não se correlacionaram com nenhuma das variáveis da capacidade fotossintética das plantas. Verificou-se a presença de um grande número de idioblastos ramificados nas folhas das plantas adultas e *in vitro* com presença de substâncias lipofílicas identificadas como sendo bixina, por meio de reação com Sudan IV e cromatografia em camada fina. Os explantes de Urucum cultivados *in vitro* apresentaram foto-inibição a partir de uma densidade de fluxo de 150 μmol m⁻² s⁻¹, identificado pela relação F_v/F_m igual a 0,581 aos 45 dias de exposição. Sob condições de foto-inibição, apenas a atividade da peroxidase apresentou incremento estatisticamente significativo, ao passo que a superóxido dismutase e a catalase não alteraram significativamente suas atividades, concluindo-se que os carotenóides não foram ativos na mitigação desse estresse.

ABSTRACT

RODRÍGUEZ ORTÍZ, Carmen Eugenia, D.S. Universidade Federal de Viçosa, September 2004. **Physiological evaluation of annatto plants (*Bixa orellana* L.)**. Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee members: Aloisio Xavier and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The present work had by objectives: (a) analysis of the photosynthetic capacity of two groups of plant material (plants with hairy green fruits and plants with hairy like-red fruits) under field conditions; (b) evaluate the development of *in vitro* explants under different light flux density; and (c) histological analysis of adult and *in vitro*-grown leaves. The experimental hypotheses were: (a) the occurrence of differences in the photosynthetic capacity between the two groups of plants; (b) some response parameters linked to net photosynthesis, light and CO₂ may be correlated with the amount of chloroplastidic pigments; (c) total carotenoids in Annatto leaves may have a photo-protective role against photo-oxidative stress, though enabling *in vitro* cultured explants to develop under high light flux density. Both groups of plants did not show statistical differences in the response curve parameters to net photosynthesis, light and CO₂. These groups displayed the following mean values: 19.17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for maximum gross photosynthesis rate; 22.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for light compensation point; 1274 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light saturation point; 15.38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for maximum net photosynthesis rate; 63.0 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ for CO₂ compensation point, and 0.1403 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for carboxylation efficiency of Rubisco. There were linear correlations between maximum quantum efficiency and light saturation point ($r = -0.7794$; $P = 0.0176$); maximum gross photosynthesis rate and light saturation point ($r = 0.8780$; $P = 0.0018$); maximum net photosynthesis rate and CO₂ compensation point ($r = -0.6242$; $P = 0.0408$); carboxylation efficiency and CO₂ compensation point ($r = -0.8208$; $P = 0.0067$); stomatal limitation of photosynthesis and intercellular CO₂ concentration for an environmental concentration of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ($r = -0.8927$; $P = 0.0012$); quantum yield and the amount of chlorophyll *a* ($r = -0.8887$; $P = 0.0014$); chlorophyll *b* ($r = -0.8505$; $P = 0.0037$) and total chlorophylls ($r = -0.9033$; $P = 0.0008$); and stomatal limitation of photosynthesis and light compensation point ($r = -0.6751$; $P = 0.0460$). No

differences were detected in the amount of chloroplastidic pigments whose means were: 1629.6 mg kg⁻¹ chlorophyll *a*, 643.4 mg kg⁻¹ chlorophyll *b* and 2272.9 mg kg⁻¹ total carotenoids. Likewise, no differences were detected between the amount of bixin in seeds of both groups, averaging 4.42%. The amount of bixin did not correlate with any variable of the photosynthetic capacity of the Annatto plants. Leaves of field and *in vitro*-plants contained a lot of branched idioblasts with lipophilic content, identified as bixin, by means of histochemical assay with Sudan IV and thin layer chromatography. Explants of Annatto showed photo-inhibition from 150 μmol m⁻² s⁻¹ light flux density, as indicated by F_v/F_m (0.581) at 45 days of culture. Under photo-inhibitory conditions, only the peroxidases activity displayed significant increase, whereas superoxide dismutase and catalase did not alter their activities, leading to the conclusion that carotenoids did not play any role in reducing stress.

CAPÍTULO I

Comparação do potencial fotossintético de dois grupos de plantas de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Resumo

Foram determinadas as curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva P/I) e à concentração intercelular de CO_2 (curva P/C_i) em dois grupos plantas de Urucum, com o objetivo de avaliar se existiriam diferenças entre os atributos fisiológicos relacionados com o potencial fotossintético dos materiais vegetais. Com relação à resposta à luz, os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima encontrados foram iguais a 16,94 e 21,40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de luz iguais a 22,0 e 23,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e do ponto de saturação de luz iguais a 1017,9 e 1530,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para os grupos de planta com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente. Quanto à resposta ao CO_2 , os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima encontrados foram iguais a 16,11 e 14,64 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de CO_2 iguais a 63,2 e 62,7 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e da eficiência carboxilativa da Rubisco iguais a 0,1312 e 0,1494 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para os grupos de planta com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente. Tanto os parâmetros das curvas de regressão P/I e P/C_i , bem como as variáveis calculadas a partir destas curvas, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos; a exceção do coeficiente de ajustamento associado à concavidade da curva para a regressão P/C_i . Ficou evidenciado, nas plantas analisadas, haver correlação linear negativa entre a eficiência quântica máxima e a irradiância de saturação ($r = -0,7794$; $P = 0,0176$), e outra positiva entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a irradiância de saturação ($r = 0,8780$; $P = 0,0018$). Por outro lado, somente uma das repetições das plantas do grupo avermelhado piloso não se comportou como o esperado, afetando a significância da correlação entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a eficiência quântica máxima ($r = -0,3770$; $P = 0,3172$). Ficou também evidenciado haver correlações lineares negativas entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima e o ponto de

compensação de CO₂ ($r = -0,6242$; $P = 0,0408$), entre a eficiência carboxilativa e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,8208$; $P = 0,0067$) e entre a limitação estomática à fotossíntese e a concentração intercelular de CO₂ para uma concentração ambiental de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ($r = -0,8927$; $P = 0,0012$).

Palavras-chaves: *Bixa orellana* L., Urucum, fotossíntese, luz, concentração intercelular de CO₂.

Introdução

O padrão de consumo das sociedades modernas vem se modificando a cada dia, estando sensível às novas descobertas acerca dos benefícios e danos de algumas práticas de consumo consagradas. Nesse sentido, o uso de corantes naturais, em substituição aos sintéticos, vem ganhando aceitação crescente nos mercados, fato que constitui matéria de farta investigação para pesquisas que buscam aumentar a quantidade, melhorar a qualidade e manter a estabilidade de produção de corantes naturais de algumas espécies vegetais.

A *Bixa orellana* L. (nomes vulgares: Urucum e Urucu, em português, Achiote, em espanhol e Annatto, em inglês), planta da família Bixaceae e nativa da América do Sul, pode ser citada como um exemplo dessas possíveis fontes de corantes naturais, sendo o Brasil um dos países que se destacam na sua produção (São José et al., 1999). De suas sementes se extraem dois pigmentos, a bixina e a norbixina, os quais são empregados em produtos alimentícios gordurosos e não-gordurosos, tais como margarinas, maioneses, queijos, sorvetes, refrigerantes, massas, produtos de panificação e em outros não-alimentícios, como cosméticos, fármacos e tintas, tanto para a indústria têxtil como para a de vernizes (São José et al., 1999; Franco et al., 2002).

Apesar dos avanços realizados nos últimos anos nos aspectos fitotécnicos, pouco tem sido feito para a obtenção de cultivares de Urucum, à exceção da seleção de tipos locais nas avaliações tradicionais dos tipos cultivados que participam de ensaios regionais e nacionais. Ainda que se disponha de alguns conhecimentos referentes à biologia floral, maturação do fruto, mecanismos de abertura das flores e métodos de polinização, há um longo caminho a ser percorrido em busca de informações para ampliar a base científica para que se possa atender a demanda dos produtores e da indústria, tanto em produtividade de grãos como em altos teores de bixina (Franco et al., 2002).

Apesar de que diferenças na capacidade fotossintética entre espécies e variedades serem de reconhecida importância para os programas de melhoramento genético de plantas, como provedor das mais diversas substâncias associadas ao metabolismo, o conhecimento dos aspectos da fisiologia do Urucum relacionados com a produção dos carotenóides bixina e norbixina ainda é escasso (Matsumoto et al., 2002; Rocha e Moraes, 1999). Fatores como o estágio de desenvolvimento da planta e o órgão

de origem, podem determinar o transporte diferenciado dos carotenóides, promovendo concentrações diferenciadas dos mesmos (Knorr e Dörnenburg, 1996).

Por outro lado, também são necessários estudos que permitam desenvolver protocolos eficientes para a propagação vegetativa incluindo a propagação *in vitro*, pois, no Brasil, a propagação da espécie é realizada principalmente a partir de sementes (São José et al., 1999). Isto permitiria a multiplicação do material com características superiores, já que os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia e outros) não satisfazem as expectativas dos produtores desta Bixaceae e nem as empresas ou instituições interessadas no processo de produção de mudas (Franco et al., 2002).

Se por um lado o sistema de propagação vegetativa tradicional traz consigo a desvantagem da necessidade da manutenção de grandes áreas de bancos de germoplasma, por outro, a propagação *in vitro* tem também algumas desvantagens, sobretudo no que se refere à necessidade de uma infra-estrutura laboratorial com requerimento de vasta gama de reagentes químicos. Assim, atualmente existem algumas propostas para otimizar a propagação vegetativa. Uma alternativa aos meios de propagação *in vitro* é a micropropagação com requerimento mínimo de infra-estrutura laboratorial e a implementação de sistemas foto-autotróficos, que possibilitam a redução na utilização de nutrientes devido ao estímulo ao processo fotossintético, além do que contribuem para o processo de aclimação do material vegetal quando levado ao campo (Kozai, 1991; Seon et al., 2000).

Pelo motivo de que a seleção de materiais vegetais empregados como plantas matrizes na propagação vegetativa pode determinar o sucesso da atividade, torna-se interessante identificar os atributos fisiológicos das plantas matrizes que habilitam seu desenvolvimento em condições edafoclimáticas particulares.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar se existiriam diferenças do potencial fotossintético entre de dois grupos de plantas de Urucum, através da análise de suas curvas de resposta da taxa fotossintética líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂, bem como dos teores de seus pigmentos cloroplastídicos.

Material e Métodos

Material Vegetal e Condições de Cultivo

As plantas de Urucum estudadas, com quatorze anos de idade, estão plantadas na área do Horto Botânico, da Universidade Federal de Viçosa.

Para efeito das avaliações, todas as plantas foram previamente podadas a uma altura de 0,50 m do solo. Os ramos jovens, com dois meses de idade, serviram como fonte de material para análise, caracteristicamente no estágio vegetativo.

Em função da variabilidade fenotípica da espécie, fez-se uma distinção do material vegetal segundo as características morfológicas de seus frutos, com a finalidade de agrupá-las segundo um critério adicional, tomando como referência a caracterização morfológica de frutos realizada por Carvalho (2000).

Assim sendo, as análises foram efetuadas para comparar dois grupos, o com frutos verde pilosos e o com frutos avermelhado pilosos. O grupo de plantas com frutos verde pilosos consistiu de quatro indivíduos, enquanto que o grupo com frutos avermelhado pilosos, de cinco.

Medições da Taxa Fotossintética Líquida

A taxa fotossintética líquida foi medida com o emprego de um sistema portátil de medição de fotossíntese, modelo LI-6400 (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Foram selecionadas, para a realização das medições, folhas saudáveis, entre a terceira e a quarta folhas no sentido basípeto, completamente expandidas e expostas à radiação solar.

Para a curva de luz foram selecionados os valores de densidade de fluxo fotossinteticamente ativo iguais a 2000, 1500, 1000, 800, 500, 100, 50, 10 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A curva de resposta da fotossíntese à concentração intercelular de CO_2 foi feita empregando-se os valores da concentração de CO_2 de análise iguais a 400, 300, 200, 100, 50, 400, 400, 600 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. A densidade de fluxo fotossinteticamente ativa empregada, neste caso, foi igual a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As seqüências dos valores selecionados, tanto para a curva de resposta da fotossíntese líquida à luz, quanto à concentração intercelular de CO₂, foram exatamente aquelas recomendadas no próprio manual de operação do aparelho.

Para ambos casos, o aparelho foi ajustado para uma temperatura do bloco igual a 25°C e fração molar de água constante durante a leitura.

Modelo Não-Linear de Resposta da Fotossíntese à Luz

Cada planta foi analisada individualmente, de forma que existiu uma curva de resposta da fotossíntese líquida à luz particular de cada repetição dentro dos dois grupos analisados.

O modelo de resposta da taxa fotossintética líquida à luz empregado foi o da hipérbole retangular para fotossíntese bruta (Baly, 1935), subtraindo-se o valor da taxa respiratória na ausência de luz (Equação 1), como proposto por Thornley (1976).

$$P_N = \frac{\alpha \cdot I \cdot P_{B(max)}}{\alpha \cdot I + P_{B(max)}} - R_d \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que: P_N = taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
 α = eficiência fotoquímica ($\mu\text{mol de CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$ de fóton incidente);
 I = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo incidente ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
 $P_{B(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
 R_d = taxa de respiração ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

O ponto de compensação de luz [$P_{C(luz)}$] foi calculado isolando-se a densidade de fluxo fotossinteticamente ativo incidente para uma taxa fotossintética líquida igual a zero na Equação 1. A estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima [$P_{N(max)}$] foi obtida subtraindo-se o valor da taxa respiratória da $P_{B(max)}$. A irradiância de saturação (I_{sat}) foi calculada isolando-se a densidade de fluxo fotossinteticamente ativo incidente (Equação 1) para uma taxa fotossintética líquida igual a 90% do valor de $P_{N(max)}$.

Para determinar os modelos particulares de cada repetição, foi empregado o programa SAS versão 6 (SAS Institute, Inc., 1990), no qual, por meio de uma rotina de análise de modelos não lineares (PROC NLIN), os dados originais foram ajustados ao modelo de resposta da fotossíntese à luz (Equação 1). Os valores iniciais atribuídos aos parâmetros α , $P_{B(max)}$ e R_d para dar início aos procedimentos de cálculo do programa foram os mais aproximados da realidade, para permitir um bom ajuste dos modelos. Estes valores foram iguais a $0,05 \text{ mol mol}^{-1}$ para α , $10,0 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $P_{B(max)}$ e $1,0 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para R_d .

Modelo Não-Linear de Resposta da Fotossíntese à Concentração Intracelular de CO₂

Para estimar a fotossíntese líquida em função da concentração intercelular de CO₂, o modelo empregado foi o utilizado por Prado et al. (1994), substituindo-se a densidade de fluxo fotossinteticamente ativo incidente pela concentração intracelular de CO₂ (Equação 2).

$$P_N = P_{N(max)} \cdot \left[1 - e^{-k \cdot (C_i - P_{C(CO_2)})} \right] \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

- P_N = taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);
- $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);
- e = base do logaritmo natural (2,718281...);
- k = constante de proporcionalidade associada à concavidade da curva ($0,001 \leq k \leq 0,009$);
- C_i = concentração intercelular de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$);
- $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Os modelos de cada repetição foram determinados com o auxílio do programa SAS versão 6 (SAS Institute, Inc., 1990), empregando-se, assim como para a curva de luz, a rotina de análise de modelos não lineares (PROC NLIN), em que os dados originais foram ajustados ao modelo de resposta da fotossíntese à concentração intercelular de CO₂ (Equação 2). Os valores iniciais atribuídos aos parâmetros $P_{N(max)}$, k

e $P_{C(CO_2)}$ para dar início aos procedimentos de cálculo do programa foram iguais a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $0,001$ e $50 \mu\text{mol mol}^{-1}$; respectivamente.

A eficiência carboxilativa da Rubisco foi estimada a partir da Equação 3.

$$E_C = k \cdot P_{N(\text{max})} \cdot e^{k \cdot P_{C(CO_2)}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que: E_C = eficiência carboxilativa da Rubisco ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
 k = constante de proporcionalidade associada à concavidade da curva ($0,001 \leq k \leq 0,009$);
 $P_{N(\text{max})}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
 $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$).

Estimativa da Limitação Estomática à Fotossíntese

A limitação estomática à fotossíntese (L_S) foi determinada a partir das curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO_2 , de acordo com o procedimento proposto por Farquhar e Sharkey (1982).

Neste caso particular, a concentração de CO_2 média do ambiente empregada nos cálculos foi igual a $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. A concentração intercelular de CO_2 nestas condições [$C_{i(400)}$] também foi empregada para analisar a L_S .

A Equação 4 traz a fórmula matemática empregada na determinação de L_S .

$$L_S = \frac{P_{Ne} - P_{Nm}}{P_{Ne}} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: L_S = limitação estomática à fotossíntese;
 P_{Ne} = fotossíntese líquida estimada pela curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO_2 , considerando $C_i = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$;
 P_{Nm} = fotossíntese líquida medida com a concentração atmosférica de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para o grupo de plantas de Urucum com fruto verde piloso e cinco repetições para o grupo com fruto avermelhado piloso.

Foi realizada uma análise de variância dos dados originais de todas as variáveis medidas e dos parâmetros das regressões, utilizando o programa SAS versão 6 (SAS Institute, Inc., 1990).

O teste de médias dos parâmetros das regressões das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂ entre os dois grupos analisados foi realizado empregando os valores obtidos das curvas encontradas para cada repetição na composição do valor médio. Através da significância do teste de F fez-se a discriminação das médias.

Resultados e Discussão

As curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz, bem como o valor dos parâmetros destas regressões, para os grupos de plantas de Urucum com fruto verde piloso e avermelhado piloso são mostrados na Figura 1 e na Tabela 1, respectivamente.

Não foi verificada qualquer diferença significativa entre todas as variáveis analisadas relacionadas com a resposta fotossintética em função da luz entre os grupos de plantas de Urucum com fruto verde piloso e com fruto avermelhado piloso (Tabela 2).

Os resultados obtidos com as plantas de Urucum analisadas neste trabalho revelam que os valores da eficiência quântica (α), entre 0,0586 a 0,1030 mol mol⁻¹, estão dentro da faixa normal apresentada pelas plantas C₃. Entretanto, estes valores são superiores aos obtidos por Rocha e Moraes (1999), em trabalho com plântulas de Urucum de 90 dias após a semeadura e cultivadas em casa de vegetação. Esses últimos autores encontraram valores da ordem de 0,028 mol mol⁻¹ para o “tipo cultivado” Peruana Paulista e de 0,024 mol mol⁻¹, para o Bico de Pato.

Em geral, quando se analisa a eficiência quântica teórica máxima, normalmente se considera um requerimento mínimo de oito fótons por molécula de CO₂ fixada, tendo em conta que a ATPase consegue sintetizar uma molécula de ATP por cada três moléculas de H⁺ que passa por ela, vinda do lúmen em direção ao estroma. Isto determina um α igual a 0,125 mol mol⁻¹ (Luo et al., 2000). Vários pesquisadores têm demonstrado que, em situações reais, têm-se encontrado para várias espécies de plantas o requerimento de 8,4 a 13,7 moles de fótons por mol de CO₂ fixado, correspondendo a um α variável de 0,119 a 0,073 mol mol⁻¹, respectivamente (Luo et al., 2000).

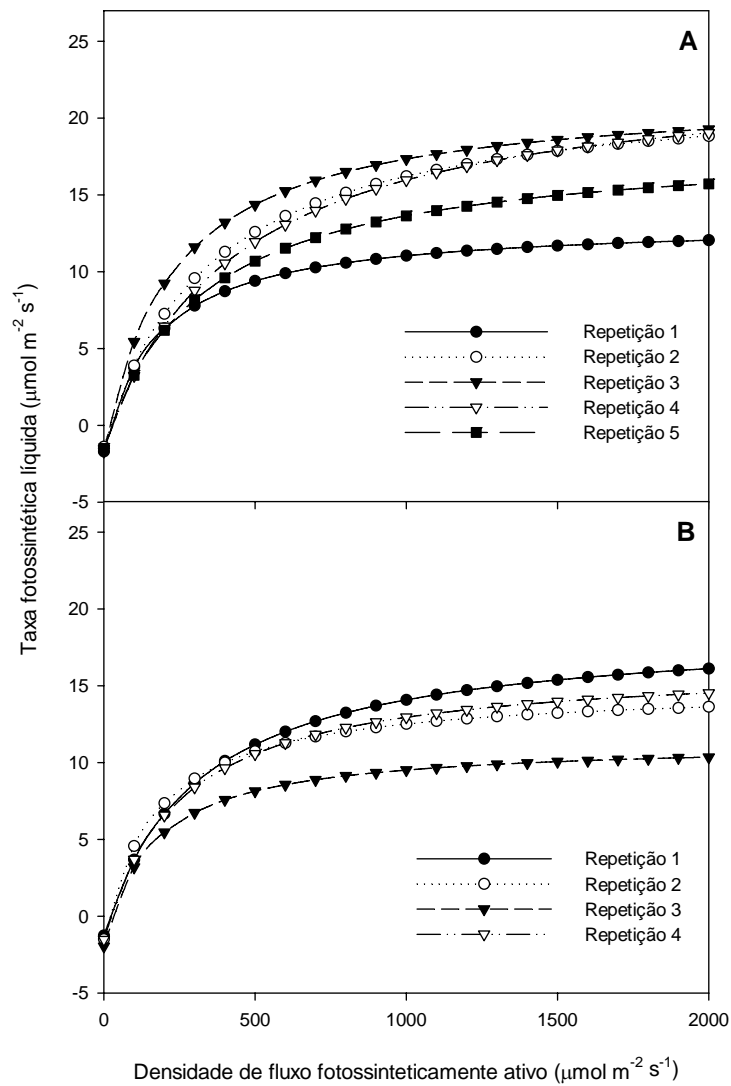


Figura 1 – Curvas características de resposta da taxa fotossintética líquida à densidade de fluxo fotossinteticamente ativo em plantas de Urucum do grupo com fruto avermelhado piloso (A) e verde piloso (B).

Tabela 1 – Valores numéricos dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e dos respectivos coeficientes de determinação das regressões em dois grupos de plantas de Urucum

Grupo	Repetição	Parâmetros da equação da fotossíntese líquida em resposta à luz			R ²
		α	$P_{B(max)}$	R_d	
Verde piloso	1	0,0657	20,04	1,27	0,999
	2	0,0961	16,40	1,50	0,996
	3	0,0843	13,29	1,97	0,999
	4	0,0734	18,03	1,52	0,999
Avermelhado piloso	1	0,0866	14,94	1,71	0,981
	2	0,0681	23,76	1,41	0,994
	3	0,1030	23,36	1,70	0,993
	4	0,0586	24,94	1,52	0,996
	5	0,0625	19,98	1,51	0,998

Nota: α = eficiência fotoquímica (mol mol^{-1}), $P_{B(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R_d = taxa respiratória ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R^2 = coeficiente de determinação da curva de regressão.

Tabela 2 – Valores dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e de variáveis calculadas a partir destas curvas, em dois grupos de plantas de Urucum

Grupo	Parâmetros da equação da fotossíntese líquida em resposta à luz			Variáveis calculadas a partir das curvas de fotossíntese líquida em resposta à luz		
	α	$P_{B(max)}$	R_d	$P_{C(luz)}$	$P_{N(max)}$	$I_{(sat)}$
Verde piloso	0,0799 a	16,94 a	1,57 a	22,0 a	15,38 a	1017,9 a
Avermelhado piloso	0,0758 a	21,40 a	1,57 a	23,2 a	19,83 a	1530,3 a

Nota: α = eficiência fotoquímica (mol mol^{-1}), $P_{B(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R_d = taxa respiratória ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(luz)}$ = ponto de compensação de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e I_{sat} = irradiância de saturação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

A estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima das plantas de Urucum girou em torno de 11,32 a 23,41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estes valores são superiores aos que se verificam para plantas decíduas do Cerrado brasileiro, em torno de 6,0 a 13,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de outras espécies decíduas já estudadas, que giram em torno dos 6,3 aos 16,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Prado e Moraes, 1997).

Segundo Larcher (1995), a capacidade fotossintética, expressa por $P_{N(max)}$, é uma característica que permite agrupar plantas vasculares com similaridades morfológicas, fisiológicas e ecológicas.

Em trabalho com plantas de Urucum de diferentes “tipos cultivados” (Peruana CPATU I, Peruana CPATU III e Bico de Pato), realizado em Vitória da Conquista (Bahia, Brasil), foram obtidos valores de taxa fotossintética líquida da ordem de 8,15 a 8,95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para uma irradiância de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Matsumoto et al. 2002). Rocha e Moraes (1999) obtiveram valores em torno de 8,36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o “tipo cultivado” Peruana Paulista e 7,35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o Bico de Pato.

Considerando a curva de luz obtida para cada repetição nesse experimento, os valores de taxa fotossintética líquida para uma irradiância de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mínimo e máximo obtidos no conjunto de plantas analisadas foram iguais a 9,14 e 16,50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, ainda superiores aos valores apresentados nos trabalhos de Matsumoto et al. (2002) e de Rocha e Moraes (1999). Esse aspecto reforça as diferenças intraespecíficas na espécie.

O ponto de compensação de luz das plantas de Urucum variou de 20,7 a 27,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. É interessante notar que esses valores são muito inferiores aos obtidos por Rocha e Moraes (1999), que foram de 85,30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o Bico de Pato e de 41,62 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o Peruana Paulista. Em geral, os valores médios obtidos de plantas adaptadas ao sol variam de 10 a 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto que para as adaptadas à sombra, variam entre 1 e 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taiz e Zeiger, 1998). Em estudos com plantas do Cerrado brasileiro, Prado e Moraes (1997) obtiveram valores desde $11 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a espécie *Tocoyena formosa*, até $46 \pm 7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a espécie *Aegiphyla lhotzkiana*.

Quanto à irradiância de saturação, as plantas de Urucum analisadas apresentaram valores que variaram de 518,6 a 2320,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores de irradiância de saturação obtidos por Prado e Moraes (1997), para plantas do Cerrado brasileiro, se situaram na faixa de 637 a 1250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em geral, para as plantas C_3 , a irradiância de saturação se situa bem abaixo da obtida a pleno sol, ao redor dos 500 a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – 25 a 50%, respectivamente – valores acima dos quais as plantas não respondem mais em termos de incremento nas taxas fotossintéticas, ocorrendo, em alguns casos, problemas de fotoinibição de plantas adaptadas à sombra ou sob condições de estresse (Long e Hällgren, 1993).

Em geral, o que se verificou com relação à taxa respiratória das plantas de Urucum analisadas, foi que elas foram muito semelhantes entre si. A taxa respiratória é comandada pelas necessidades de crescimento e manutenção do metabolismo normal das plantas. De uma maneira geral, as plantas adaptadas à sombra possuem uma limitação na assimilação do carbono e, por conta disso, menores taxas de respiração de crescimento, quando comparadas com plantas adaptadas ao sol. Quanto à respiração de manutenção, para atender às necessidades da estabilidade dos níveis de proteínas e enzimas com alto giro, gradientes iônicos e outros processos celulares, as plantas de sombra também se caracterizam por possuírem menores taxas de respiração de manutenção por unidade de área foliar, mas não por unidade de massa foliar (Percy e Sims, 1994).

A Tabela 3 traz informações do grau de associação entre as variáveis relacionadas com a resposta das plantas à luz. Tomando-se o nível de significância igual a 5%, nota-se que apenas as variáveis α e $P_{B(max)}$ mostraram alguma correlação com $I_{(sat)}$.

Tabela 3 – Análise do grau de associação entre os parâmetros da curva de resposta da fotossíntese líquida à luz, o ponto de compensação de luz e a irradiância de saturação em plantas de Urucum dos grupos com fruto verde piloso e avermelhado piloso

Variáveis	Valores do coeficiente de correlação linear (r) e respectivo nível de probabilidade (P)									
	α		$P_{B(max)}$		R_d		$P_{C(luz)}$		$I_{(sat)}$	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
α	-	-	-0,3770	0,3172	0,5205	0,1508	-0,6546	0,0557	-0,7794	0,0176
$P_{B(max)}$	-0,3770	0,3172	-	-	-0,5201	0,1512	-0,0330	0,9328	0,8780	0,0018
R_d	0,5205	0,1508	-0,5201	0,1512	-	-	0,2968	0,4381	-0,6535	0,0563
$P_{C(luz)}$	-0,6546	0,0557	-0,0330	0,9328	0,2968	0,4381	-	-	0,2823	0,4671
$I_{(sat)}$	-0,7794	0,0176	0,8780	0,0018	-0,6535	0,0563	0,2823	0,4671	-	-

Nota: α = eficiência fotoquímica (mol mol^{-1}), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R_d = taxa respiratória ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(luz)}$ = ponto de compensação de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e $I_{(sat)}$ = irradiância de saturação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Nota-se que as plantas com maior eficiência fotoquímica se saturam a baixas irradiâncias. Poder-se-ia esperar que houvesse uma correlação negativa entre a eficiência fotoquímica e a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima. Isso porque, em plantas mais adaptadas à sombra, o aumento na eficiência fotoquímica é exatamente o fator que possibilita que as taxas fotossintéticas alcancem mais facilmente sua saturação, permanecendo estáveis a partir de baixas irradiâncias; nas plantas de sol, a redução na eficiência fotoquímica possibilita maior amplitude de resposta, aumentando-se as taxas fotossintéticas líquidas com o aumento da irradiância, elevando-se o patamar do valor da taxa fotossintética de saturação.

Neste caso particular, dentro do conjunto de plantas analisadas, existe uma planta que contribui para não tornar essa expectativa verdadeira. Precisamente a repetição 3 do grupo avermelhado piloso é aquela que possui maior valor da eficiência fotoquímica e, ao mesmo tempo, está entre as plantas com maior valor da estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima. Entretanto, se na análise de correlação entre α e $P_{B(max)}$ for retirada essa repetição, obtém-se exatamente a resposta esperada, com um $r = -0,8084$ a uma $P = 0,0151$.

Por outro lado, os valores de $P_{B(max)}$ mostraram-se positivamente correlacionados com os de $I_{(sat)}$, indicando que plantas mais adaptadas ao sol se saturam a maiores irradiâncias e apresentam valores mais altos da taxa fotossintética de saturação.

As curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO_2 , bem como o valor dos parâmetros destas regressões, para os grupos de plantas de Urucum com fruto verde piloso e avermelhado piloso são mostradas na Figura 2 e Tabela 4, respectivamente.

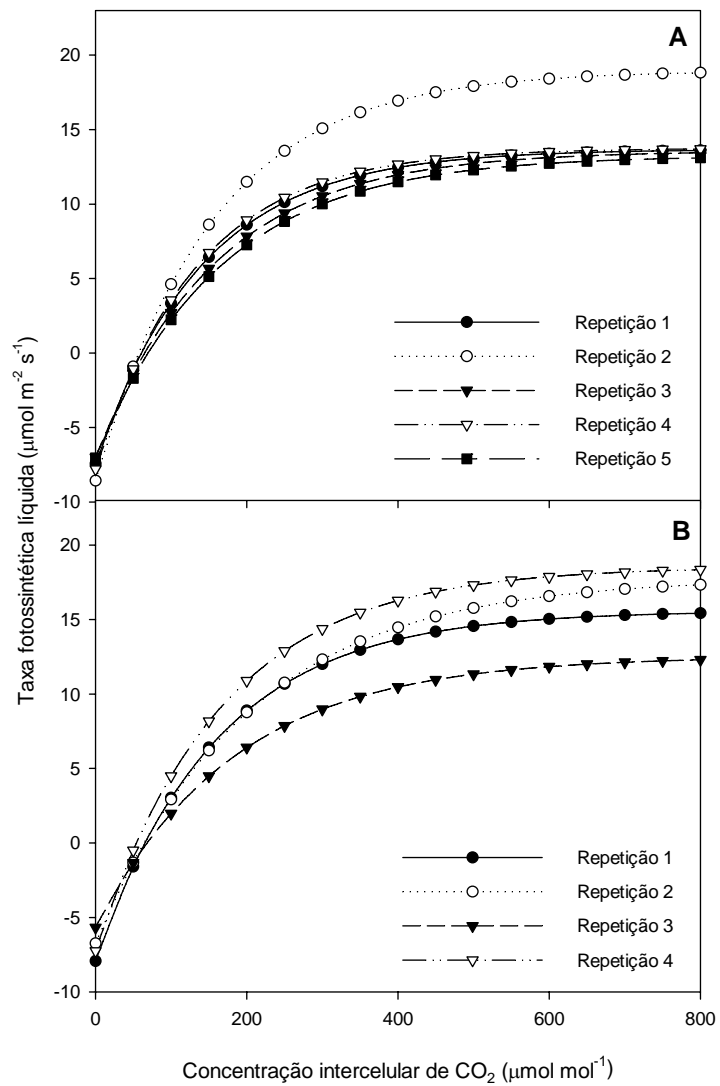


Figura 2 – Curvas características de resposta da taxa fotossintética líquida à concentração intercelular de CO₂ em plantas de Urucum do grupo com fruto avermelhado piloso (A) e verde piloso (B).

Tabela 4 – Valores dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂ e dos respectivos coeficientes de determinação das regressões em dois grupos de plantas de Urucum

Grupo	Repetição	Parâmetros da equação da fotossíntese líquida em resposta à luz			R ²
		$P_{N(max)}$	$P_{C(CO_2)}$	k	
Verde piloso	1	15,58	65,6	0,0063	0,998
	2	17,79	64,2	0,0050	0,998
	3	12,53	68,6	0,0055	0,994
	4	18,55	54,4	0,0061	0,995
Avermelhado piloso	1	13,67	60,9	0,0071	0,994
	2	18,97	57,2	0,0065	0,997
	3	13,57	65,3	0,0064	0,996
	4	13,75	60,1	0,0075	0,991
	5	13,26	69,8	0,0061	0,988

Nota: $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), k = coeficiente de concavidade da curva (adimensional), R² = coeficiente de determinação da curva de regressão.

A comparação de médias dos parâmetros das curvas da fotossíntese líquida em resposta à concentração intercelular de CO₂ revelou não haver diferença significativa entre $P_{N(max)}$ e $P_{C(CO_2)}$ para os grupos de plantas de Urucum analisadas (Tabela 5). Unicamente o coeficiente ajustamento associado à concavidade das curvas é que foi o parâmetro que diferiu entre estes grupos de plantas.

De igual forma, não foi verificada qualquer diferença significativa entre as variáveis E_C , L_S e $C_{i(400)}$, quando comparados estes dois grupos de plantas de Urucum (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂ e de variáveis calculadas a partir destas curvas, em dois grupos de plantas de Urucum

Grupo	Parâmetros da equação da fotossíntese líquida em resposta à concentração intercelular de CO ₂			Variáveis calculadas a partir das curvas de fotossíntese líquida em resposta à concentração intercelular de CO ₂		
	$P_{N(max)}$	k	$P_{C(CO_2)}$	E_C	L_S	$C_{i(400)}$
Verde piloso	16,11 a	0,0057 a	63,2 a	0,1312 a	0,1025 a	303,2 a
Avermelhado piloso	14,64 a	0,0067 b	62,7 a	0,1494 a	0,0610 a	315,6 a

Nota: $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), k = constante de proporcionalidade associada à concavidade da curva (adimensional), $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), E_C = eficiência carboxilativa da Rubisco ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), L_S = limitação estomática à fotossíntese (adimensional) e $C_{i(400)}$ = concentração intercelular de CO₂ para uma concentração ambiente de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

A análise do grau de associação entre os parâmetros das curvas da fotossíntese líquida em resposta à concentração intercelular de CO₂, bem como das variáveis a elas associadas, revelou haver correlações lineares negativas entre $P_{N(max)}$ e $P_{C(CO_2)}$, entre E_C e $P_{C(CO_2)}$ e entre L_S e $C_{i(400)}$, significativas a 5% de probabilidade (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise do grau de associação entre os parâmetros da curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂, a eficiência carboxilativa da Rubisco e a limitação estomática da fotossíntese em plantas de Urucum dos grupos com fruto verde piloso e avermelhado piloso

Variáveis	Valores do coeficiente de correlação linear (r) e respectivo nível de probabilidade (P)									
	$P_{N(max)}$		$P_{C(CO_2)}$		E_C		L_S		$C_{i(400)}$	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
$P_{N(max)}$	-	-	-0,6872	0,0408	0,5521	0,1232	0,2767	0,4711	-0,0894	0,8190
$P_{C(CO_2)}$	-0,6872	0,0408	-	-	-0,8204	0,0067	0,3773	0,3168	-0,5585	0,1180
E_C	0,5521	0,1232	-0,8204	0,0067	-	-	-0,5045	0,1660	0,5019	0,1686
L_S	0,2767	0,4711	0,3773	0,3168	-0,5045	0,1660	-	-	-0,8927	0,0012
$C_{i(400)}$	-0,0894	0,8190	-0,5585	0,1180	0,5019	0,1686	-0,8927	0,0012	-	-

Nota: $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), E_C = eficiência carboxilativa da Rubisco ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), L_S = limitação estomática da fotossíntese (adimensional) e $C_{i(400)}$ = concentração intercelular de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) para uma concentração atmosférica de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

Em se tratando de difusão gasosa, a fotossíntese pode ser limitada tanto pelas restrições estomáticas quanto pelas restrições do mesofilo. Em condições normais, a concentração intercelular de CO₂ do ponto de inflexão da curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂ é bastante aproximada da própria concentração de CO₂ do ar ambiente, o que significa que a limitação estomática é bastante pequena. Contudo, essa situação pode variar, sempre e quando houver algum fator que contribua para alterar as condições normais. Nesses casos, quando há restrições devidas às limitações estomáticas, a concentração de CO₂ intercelular diminui e, por outro lado, quando a maior restrição se deve ao mesofilo, então, o que se nota é um incremento desta (Long, 1986). No caso específico da população de plantas de Urucum analisadas, nota-se que esse padrão geral se faz notar. Há uma correlação linear negativa entre a limitação estomática e a concentração intercelular de CO₂ calculada para uma concentração ambiental de 400 μmol mol⁻¹ (Tabela 6).

Um outro aspecto, revelado pela análise de correlação entre as variáveis, foi o de que as plantas com maiores valores de $P_{N(max)}$ e de E_C são as que apresentam menores valores de $P_{C(CO_2)}$ (Tabela 6), indicando que as plantas mais sensíveis ao CO₂ são também as que apresentam maior afinidade pelo substrato. Sabe-se que o início da curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂, para valores baixos de C_i , segue a cinética enzimática da Rubisco (von Caemmerer e Farquhar, 1981).

Um dos fatores que pode interferir diretamente na atividade carboxilativa da Rubisco é a pressão parcial de O₂, predispondo a planta ao incremento nas taxas de fotorrespiração. Porém, a própria quantidade da Rubisco na sua forma ativa, independentemente da fotorrespiração, também pode ser outro fator. No caso particular das plantas de Urucum, uma vez que não se fez qualquer identificação nesse sentido, ambos os fatores podem ter afetado a atividade carboxilativa da Rubisco.

Conclusões

De maneira geral, ambos os grupos de plantas de Urucum, o que apresenta fruto verde piloso e o que apresenta fruto avermelhado piloso, apresentam características semelhantes no que se refere ao seu potencial fotossintético.

Não ficou evidenciada qualquer diferença significativa dos parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz entre as plantas de Urucum dos dois grupos e tampouco foi encontrada alguma diferença entre o ponto de compensação de luz e a irradiância de saturação entre eles.

Os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima encontrados foram iguais a 16,94 e 21,40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de luz iguais a 22,0 e 23,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e do ponto de saturação de luz iguais a 1017,9 e 1530,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para os grupos de planta com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente.

Foi verificada uma correlação linear negativa entre a eficiência quântica máxima e a irradiância de saturação ($r = -0,7794$; $P = 0,0176$) e outra positiva entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a irradiância de saturação ($r = 0,8780$; $P = 0,0018$). Dada a variabilidade genética das plantas de Urucum, a eliminação da repetição 3 do grupo de plantas com fruto avermelhado piloso permitiu, também, identificar outra correlação linear negativa entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a eficiência quântica máxima ($r = -0,8084$; $P = 0,0151$).

O coeficiente associado à concavidade da curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO_2 foi o único parâmetro da regressão que diferiu entre as plantas de Urucum dos dois grupos analisados, não havendo diferenças entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima e do ponto de compensação de CO_2 . De igual forma, não foram encontradas diferenças entre os valores da limitação estomática à fotossíntese, eficiência carboxilativa da Rubisco e concentração intercelular de CO_2 para uma concentração atmosférica de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ entre estes grupos de plantas.

Os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima encontrados foram iguais a 16,11 e 14,64 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de CO_2 iguais a 63,2 e 62,7 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e da eficiência carboxilativa da

Rubisco iguais a 0,1312 e 0,1494 mol m⁻² s⁻¹, para os grupos de planta com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente.

Ficou evidenciado haver correlações lineares negativas entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,6842$; $P = 0,0408$) entre a eficiência carboxilativa e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,8208$; $P = 0,0067$) e entre a limitação estomática à fotossíntese e a concentração intercelular de CO₂ para uma concentração ambiental de 400 μmol mol⁻¹ ($r = -0,8927$; $P = 0,0012$).

Referências Bibliográficas

- Baly, E.C.C. 1935.** The kinetics of photosynthesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **117**:218-239.
- Carvalho, J.F.R.P. 2000.** *Análise cariotípica e indução in vitro de poliploidia em Urucum (Bixa orellana L.)*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Doutorado. 124 p.
- Farquhar, G.D.; Sharkey, T.D. 1982.** Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, **33**:317-345.
- Franco, C.F. de O.; Silva, F. de C.P. da; Cazé Filho, J.; Barreiro Neto, M.; São José, A.R.; Rebouças, R.N.H.; Fontinelli, I.S.C. 2002.** *Urucuzeiro. Agronegócios de Corantes Naturais*. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A., João Pessoa. 120 p.
- Knorr, D.; Dörnenburg, H. 1996.** Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical Review in Plant Science*, **15**:141-168.
- Kozai, T. 1991.** Micropropagation under photoautotrophic conditions. **In:** *Micropropagation: Technology and application* (P.G. Debergh; R.H. Zimmermann eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 447-469.
- Larcher, W. 1995.** Carbon utilization and dry matter production. **In:** *Physiological Plant Ecology* (W. Larcher). Springer, Berlin. pp. 57-166.
- Long, S.P. 1986.** Instrumentation for the measurement of CO₂ assimilation by crop leaves. **In:** *Advanced Agricultural Instrumentation* (W.G. Gensler, Ed.). Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp. 39-91.
- Long, S.P. ; Hällgren, J.-E. 1993.** Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. **In:** *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual* (D. O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhår-Nordenkampf, R.C. Leegood, S.P. Long, eds.). Chapman & Hall, London. pp. 129-167.
- Luo, Y.; Hui, D.; Cheng, W.; Coleman, J.S.; Johnson, D.W.; Sims, D.A. 2000.** Canopy quantum yield in a mesocosm study. *Agricultural and Forest Meteorology*, **100**:35-48.
- Matsumoto, S.N.; Viana, A.E.S.; São José, A.R.; Cardoso, A.D., Aguilar, M.A.G. 2002.** Growth and photosynthetic characteristics of annato plants. *Acta Horticulturae*, **596**:249-256.
- Prado, C.H.B.A. ; Moraes, J.A.P.V. de 1997.** Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions. *Photosynthetica*, **33**:103-112.

- Prado, C.H.B.A.; Moraes, J.A.P.V. de; Mattos, E.A. de. 1994.** Gas exchange and leaf water status in potted plants of *Copaifera langsdorffii*. 1. Responses to water stress. *Photosynthetica*, **30**:207-213.
- Rocha, A.M. dos S.; Moraes, J.A.P.V. 1999.** Capacidade fotossintética e ponto de compensação à luz em dois “tipos” de urucum (*Bixa orellana* L.) cultivadas em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **3**:103-108.
- SAS Institute Inc. 1990.** *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed., v. 2, SAS Institute, Cary. 796 p.
- São José, A.R.; Mascarenhas, J.M.O.; Stringheta, P.C.; Rebouças, T.N.H.; Oliveira, V.P. de. 1999.** Cultivo del achiote (*Bixa orellana*) en Brasil. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **3**:113-119.
- Seon, J.-H.; Cui, Y.-Y.; Kozai, T. ; Paek, K.-Y. 2000.** Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **61**:135-142.
- Taiz, L. ; Zeiger, E. 1998.** Photosynthesis: physiological and ecological considerations. **In:** *Plant Physiology* (L. Taiz; E. Zeiger). Sinauer Associates, Sunderland. pp. 227-249.
- Thornley, J.H.M. 1976.** *Mathematical Models in Plant Physiology*. Academic Press, London. 318 p.
- von Caemmerer, S.; Farquhar, G.D. 1981.** Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, **153**:376-387.
- Pearcy, R.W.; Sims, D.A. 1994.** Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant. **In:** *Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants: Ecophysiological Process Above and Below Ground* (M.M. Caldwell; R.W. Pearcy, eds.). Academic Press, San Diego. pp. 223-234.

CAPÍTULO II

Avaliação do grau de associação entre o teor dos pigmentos cloroplastídicos, a capacidade fotossintética e o teor de bixina das sementes em dois grupos de plantas de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de associação entre os teores dos pigmentos cloroplastídicos e os parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂ em dois grupos de plantas de Urucum, o com fruto verde piloso e o com fruto avermelhado piloso, sob mesmas condições de cultivo. Verificou-se que ambos os grupos não diferiram entre si nos teores de pigmentos cloroplastídicos e nos teores de bixina presentes nas sementes. Os teores de bixina de 4,28% e 4,55%, apresentados pelas plantas com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente, as classificam como boas produtoras do corante. Foram encontradas correlações lineares negativas entre a eficiência quântica e o teor de clorofila *a* ($r = -0,8887$; $P = 0,0014$), clorofila *b* ($r = -0,8505$; $P = 0,0037$) e clorofilas totais ($r = -0,9033$; $P = 0,0008$), indicando uma certa tendência na limitação da utilização da energia dos fótons de luz, porém, sem maiores conseqüências sobre a capacidade fotossintética das plantas, dado a que esta mesma eficiência quântica não se correlacionou com a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima, a eficiência carboxilativa da Rubisco e a limitação estomática à fotossíntese. Por outro lado, a limitação estomática à fotossíntese se correlacionou negativamente com o ponto de compensação de luz ($r = -0,6751$; $P = 0,0460$). Os teores de bixina não se correlacionaram com nenhuma das variáveis relacionadas com a capacidade fotossintética das plantas.

Palavras-chaves: *Bixa orellana* L., Urucum, fotossíntese, luz, CO₂ intercelular, pigmentos cloroplastídicos.

Introdução

A fotossíntese é um processo que tem início com a captura de fótons de radiação fotossinteticamente ativa pelos pigmentos cloroplastídicos. Se, por um lado as variações nos teores desses pigmentos podem indicar um ajuste das plantas às condições particulares do meio em que se encontram, por outro, sob mesmas condições ambientais, as variações podem refletir diferenças intrínsecas do potencial de cada material vegetal. O processo fotossintético é dependente, em primeira medida, da etapa fotoquímica na qual os pigmentos cloroplastídicos desempenham um papel fundamental na captação da luz e, em especial, os carotenóides também agem como protetores dos possíveis danos fotoinibitórios (Young, 1991; Taiz e Zeiger, 1998; Sandmann e Scheer, 1998; Buchanan et al., 2000). Por sua vez, a fotossíntese contribui como fonte primária de substâncias essenciais ao metabolismo global das plantas. O crescimento, as mudanças sucessivas de fase e, finalmente a produção são processos que se iniciam com a assimilação do CO₂ da atmosfera através do processo fotossintético (Loomis e Connor, 1992).

Assim, este trabalho, teve por objetivo avaliar o grau de associação entre os teores dos pigmentos cloroplastídicos e os parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂, ou variáveis calculadas a partir dessas curvas, para verificar se há algum padrão característico em plantas de Urucum dos grupos fruto verde piloso e fruto avermelhado piloso.

Material e Métodos

Material Vegetal, Condições de Cultivo e Determinação das Variáveis Relacionadas com as Curvas de Resposta da Fotossíntese Líquida à Luz e à Concentração Intercelular de CO₂

O material vegetal, as condições de cultivo e as variáveis utilizadas para caracterizar a capacidade fotossintética das plantas segundo as suas curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂ estão descritos no Capítulo I.

Determinação dos Teores de Pigmentos Cloroplastídicos

A determinação dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides totais foi feita de acordo com o método proposto por Lichthenthaler (1987), porém, com algumas modificações.

Os procedimentos que se seguem foram realizados em um quarto com luz de interferência de baixa irradiância na faixa do verde (apenas uma luz fluorescente coberta com duas camadas de papel celofane verde).

Tomaram-se aproximadamente 30 mg do material vegetal (folhas) as quais foram maceradas com a mesma quantidade de carbonato de cálcio em 500 µL de acetona 80%. A acetona e demais soluções voláteis com alta pressão de vapor foram dispensadas com a técnica da pipetagem reversa empregando um tempo de espera inicial para permitir suficiente pressão parcial de vapor no interior da câmara da pipeta, antes de serem dispensadas, procedimentos para evitar perda destas soluções.

O material macerado foi transferido quantitativamente para um microtubo de 2 mL, por meio de uma primeira lavagem do cadinho com 500 µL de acetona 80% e, finalmente, uma segunda e última lavagem com outros 500 µL de acetona 80% adicionais.

Os microtubos com o macerado foram levados à microcentrífuga e centrifugados a 6.000 g por 10 minutos.

Uma alíquota de 800 µL do sobrenadante de cada microtubo foi retirada e colocada em tubo de ensaio contendo 1,5 mL de acetona 80%, para uma primeira diluição o extrato original. Esse tubo de ensaio foi previamente encapado com papel de alumínio para evitar o contato com a luz.

Em seguida, efetuou-se um teste de leitura da absorbância de algumas amostras nos comprimentos de onda de 663,2; 646,8 e 470 nm, empregando-se como branco acetona a 80%, com a utilização de um espectrofotômetro UV-visível modelo (Hitashi, Japão).

Como as absorbâncias alcançaram valores acima da faixa de leitura ideal, que se situa entre 0,2 e 0,8; houve necessidade de se diluir novamente os extratos em três vezes, empregando acetona a 80% no processo de diluição.

Determinação do Teor de Bixina nas Sementes

Frutos maduros coletados a partir das plantas utilizadas na avaliação de sua capacidade fotossintética (Capítulo I) foram empregados como fonte de sementes para a quantificação dos teores de bixina nas mesmas.

Antes das análises, os frutos foram secos em estufa a 40°C até que as sementes atingissem cerca de 10% de umidade.

O método empregado para a determinação do teor de bixina foi o descrito por Stringheta et al. (1999), que consiste na extração dos pigmentos das sementes por uma solução de KOH (hidróxido de potássio) e óleo de mamona. A foi realizada mediante a leitura da absorbância a 480 nm em espectrofotômetro, convertendo-se os resultados, através de um fator de ajustamento (leitura x 6,97), para valores em porcentagens de bixina.

Foram analisadas amostras de sementes de cada uma das repetições dos dois grupos plantas, empregando-se a média de três alíquotas para compor o valor de cada repetição.

Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para o grupo de plantas de Urucum com fruto verde piloso e cinco repetições para o grupo com fruto avermelhado piloso.

Foi realizada uma análise de variância dos dados originais de todas as variáveis medidas e análises de correlação linear entre os teores de pigmentos cloroplastídicos, os teores de bixina das sementes, as variáveis relacionadas com as curvas de respostas da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂, utilizando o programa SAS versão 6 (SAS Institute, Inc., 1990). A comparação de médias foi realizada mediante o teste de F a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Não foi verificada qualquer diferença significativa nos teores dos pigmentos cloroplastídicos e no teor de bixina das sementes nos dois grupos de plantas de Urucum analisados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valor dos teores de pigmentos cloroplastídicos e de bixina das sementes em dois grupos de plantas de Urucum

Grupos	Teor de pigmentos cloroplastídicos					Teor de bixina
	C_a	C_b	C_a/C_b	C_{tot}	Car_{tot}	
Verde piloso	1694,5 a	663,1 a	2,55 a	2357,5 a	429,5 a	4,28 a
Avermelhado piloso	1564,6 a	623,6 a	2,56 a	2188,3 a	462,3 a	4,55 a

Nota: C_a = teor de clorofila a (mg kg^{-1}), C_b = teor de clorofila b (mg kg^{-1}), C_a/C_b = relação entre os teores de clorofila a e clorofila b ; C_{tot} = teor de clorofilas totais (mg kg^{-1}), Car_{tot} = teor de carotenóides totais (mg kg^{-1}). O teor de bixina está sendo expresso em porcentagem. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Com relação à espécie estudada, não existem informações disponíveis na literatura semelhante aos estudos que foram realizados nesse trabalho, o que dificulta uma análise comparativa dos resultados. Em comparação com outras espécies, que também são plantas nativas da América do Sul, os teores de pigmentos cloroplastídicos encontrados no Urucum não diferem muito. Por exemplo, no trabalho realizado por, Em plantas de Mogno e de Cumbaru, foram encontrados teores de clorofila a da ordem de 1021, 2 a 2588,1 mg kg^{-1} ; de clorofila b , entre 554,5 a 885,4 mg kg^{-1} e de carotenóides totais entre 461,7 a 689,7 mg kg^{-1} , dependendo do regime de luz a que as plantas foram submetidas (Gonçalves et al., 2001)

Por outro lado, são valores bem elevados, se estes resultados forem comparados com os valores geralmente observados em outras plantas não nativas, como é o caso do Café, com valores de clorofila a da ordem de 134,7 mg kg^{-1} ; de clorofila b , de 40,9 mg kg^{-1} e de carotenóides, de 22,6 mg kg^{-1} (Oliveira et al., 2002).

Os teores de bixina presentes nas sementes de ambos grupos de planta analisados podem ser considerados elevados. De acordo com São José et al. (1999), em um trabalho envolvendo 30 acessos do Banco de Germoplasma de plantas de Urucum em Vitória da Conquista (Bahia, Brasil), contendo plantas de todo território nacional,

verificou-se que os teores de bixina destas plantas se encontravam variando desde 0,96% até 4,44%, ficando a média nacional na faixa de 1,8 a 2,2%. Em outro estudo com sete cultivares nacionais de Urucum, os teores de bixina encontrados variaram de 1,75% a 4,00 % (Franco et al., 2002). Morais et al. (1999) consideram que os teores de bixina nas sementes dependem do material vegetal e das condições ecológicas da região, podendo variar de 1,0 a 6,0%.

Quando se analisou o grau de associação possivelmente existente entre os teores de pigmentos cloroplastídicos e os parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂, o que se identificou foi que somente a eficiência fotoquímica esteve negativamente correlacionada com o teor de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais (Tabela 2). Não foi verificado, para os demais pigmentos e parâmetros das curvas de fotossíntese, qualquer correlação significativa (Tabelas 2). Tampouco se verificou qualquer grau de associação das variáveis e dos parâmetros associados às respostas das plantas à luz e ao CO₂ entre si (Tabela 3).

Tabela 2 – Análise do grau de associação entre o teor de pigmentos cloroplastídicos e os parâmetros da curva de fotossíntese em função da luz, o ponto de compensação luminoso e a irradiância de saturação, em plantas de Urucum do grupo com fruto verde piloso e avermelhado piloso

Variável ou parâmetro	Teor de pigmentos cloroplastídicos										Teor de bixina	
	<i>C_a</i>		<i>C_b</i>		<i>C_a/C_b</i>		<i>C_{tot}</i>		<i>Car_{tot}</i>		<i>r</i>	<i>P</i>
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>		
α	-0,8887	0,0014	-0,8505	0,0037	-0,1461	0,7076	-0,9033	0,0008	0,5794	0,1021	-0,3568	0,3504
$P_{B(max)}$	0,1656	0,6703	-0,0789	0,8401	0,5192	0,1520	0,1042	0,7896	0,2776	0,4696	-0,0196	0,9600
R_d	-0,3989	0,2876	-0,3706	0,3262	-0,0488	0,9008	-0,4025	0,2829	0,0696	0,8588	-0,4536	0,2201
$P_{C(luz)}$	0,6208	0,0744	0,6021	0,0863	0,1120	0,7742	0,6331	0,0672	-0,5486	0,1261	0,0038	0,9923
I_S	0,6065	0,0834	0,4306	0,2472	0,3981	0,2886	0,5760	0,1045	-0,1315	0,7359	0,2204	0,5688
$P_{N(max)}$	0,0555	0,8872	0,0658	0,8663	-0,0563	0,8856	0,0599	0,8784	-0,0385	0,9216	0,0282	0,9427
$P_{C(CO_2)}$	0,0749	0,8481	-0,0690	0,8599	0,2614	0,4969	0,0381	0,9224	-0,1497	0,7007	0,0662	0,8655
E_C	0,1727	0,6568	0,2178	0,5735	-0,0669	0,8642	0,1897	0,6250	0,1148	0,7687	0,3108	0,4157
L_S	-0,2540	0,5096	-0,4313	0,2465	0,2637	0,4930	-0,3089	0,4186	0,1631	0,6751	-0,2643	0,4919
$C_{i(400)}$	-0,0382	0,9222	0,2992	0,4341	-0,5642	0,1135	0,0518	0,8947	-0,0614	0,8752	0,1314	0,7361

Nota: C_a = teor de clorofila *a* (mg kg⁻¹), C_b = teor de clorofila *b* (mg kg⁻¹), C_a/C_b = relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b*; C_{tot} = teor de clorofilas totais (mg kg⁻¹), Car_{tot} = teor de carotenóides totais (mg kg⁻¹), α = eficiência fotoquímica (mol mol⁻¹), $P_{B(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R_d = taxa respiratória ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(luz)}$ = ponto de compensação de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), I_{sat} = irradiância de saturação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), E_C = eficiência carboxilativa da Rubisco (mol m⁻² s⁻¹), L_S = limitação estomática à fotossíntese (adimensional), $C_{i(400)}$ = concentração intercelular de CO₂ para uma concentração atmosférica de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); *r* = coeficiente de correlação linear e *P* = nível de probabilidade. O teor de bixina foi expresso em porcentagem.

Sabe-se que os pigmentos cloroplastídicos são partícipes da etapa fotoquímica da fotossíntese, sendo responsáveis pela captura da energia contida nos fótons de luz e pela transferência até os centros de reação dos fotossistemas. As clorofilas *a* e *b* estão presentes em todos os organismos que realizam fotossíntese, tendo a água como doadora de elétrons ao sistema. A clorofila *a* é o pigmento mais abundante nos complexos coletores de luz e presente também nos centros de reação, ao passo que a clorofila *b* se encontra em menor quantidade e está presente, exclusivamente, nos complexos coletores de luz (Sandmann e Scheer, 1998; Buchanan et al., 2000).

A relação C_a/C_b verificada nas plantas de Urucum esteve dentro dos limites normalmente verificados nas plantas em geral (Tabela 1). Para o complexo coletor de luz relacionado ao fotossistema I, a relação C_a/C_b varia de 2,0 a 4,4 e para aquele relacionado ao fotossistema II a relação C_a/C_b varia de 1,5 a 4,0 (Morishige e Dreyfuss, 1998; Buchanan et al., 2000). Nota-se, como uma adaptação à baixa irradiância, o incremento da concentração de clorofila *a*, elevando assim a relação C_a/C_b como forma de compensar o processo fotossintético (Ishii, 1998).

Tabela 3 – Análise de correlação linear entre os parâmetros das curvas de fotossíntese em resposta à luz e à concentração intracelular de CO₂ e variáveis calculadas com base nessas curvas, em plantas de Urucum do grupo com fruto verde piloso e avermelhado piloso

Variáveis relacionadas à resposta da fotossíntese à luz	Variáveis relacionadas à resposta da fotossíntese ao CO ₂									
	$P_{N(max)}$		$P_{C(CO_2)}$		E_C		L_S		$C_{i(400)}$	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
α	-0,0721	0,8538	0,1764	0,6499	-0,4633	0,2091	0,5447	0,1294	-0,2837	0,4594
$P_{B(max)}$	0,1440	0,7116	-0,2560	0,5062	0,6026	0,0859	-0,2145	0,5794	0,0592	0,8798
R_d	-0,5858	0,0974	0,2910	0,4474	-0,6129	0,0793	-0,1018	0,7944	0,1509	0,6983
$P_{C(luz)}$	-0,4629	0,2096	0,1027	0,7927	-0,0668	0,8645	-0,6751	0,0460	0,4246	0,2547
I_S	0,0715	0,8550	-0,2335	0,5455	0,6068	0,0831	-0,4851	0,1856	0,2188	0,5717

Nota: C_a = teor de clorofila *a* (mg kg⁻¹), C_b = teor de clorofila *b* (mg kg⁻¹), C_a/C_b = relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b*; C_{tot} = teor de clorofilas totais (mg kg⁻¹), Car_{tot} = teor de carotenóides totais (mg kg⁻¹), α = eficiência fotoquímica (mol mol⁻¹), $P_{B(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima (μmol m⁻² s⁻¹), R_d = taxa respiratória (μmol m⁻² s⁻¹), $P_{C(luz)}$ = ponto de compensação de luz (μmol m⁻² s⁻¹), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima (μmol m⁻² s⁻¹), I_{sat} = irradiância de saturação (μmol m⁻² s⁻¹), $P_{N(max)}$ = estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima (μmol m⁻² s⁻¹), $P_{C(CO_2)}$ = ponto de compensação de CO₂ (μmol mol⁻¹), E_C = eficiência carboxilativa da Rubisco (mol m⁻² s⁻¹), L_S = limitação estomática à fotossíntese (adimensional), $C_{i(400)}$ = concentração intercelular de CO₂ para uma concentração atmosférica de 400 μmol mol⁻¹ (μmol mol⁻¹); r = coeficiente de correlação linear e P = nível de probabilidade.

Em geral, as plantas que apresentam maiores teores de Rubisco são mais sensíveis tanto ao incremento da irradiância fotossinteticamente ativa, quanto ao da concentração atmosférica de CO₂. Por outro lado, elevados níveis protéicos requerem elevadas taxas de respiração de manutenção para responder à demanda metabólica referente aos processos de giro das proteínas. Normalmente, esta situação é a que se apresenta em plantas adaptadas ao sol e, a situação inversa, em plantas adaptadas à sombra (Larcher, 1995).

A correlação negativa entre a eficiência quântica e os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais (Tabela 2), revela a tendência de uma crescente ineficiência do uso da energia luminosa, à medida que aumentam os níveis desses pigmentos no cloroplasto. Esse fenômeno está associado ao fato de que quanto mais adaptadas à sombra, maiores são os valores da eficiência quântica e menores são os teores de clorofilas por unidade de área foliar (mas não por unidade de massa foliar) e de componentes como proteínas, enzimas, dentre outros, o que faz com que essas plantas apresentem uma economia na respiração de manutenção em relação às plantas com adaptação a maiores irradiâncias (Boordman, 1997). Entretanto, no conjunto de plantas analisadas, esse fenômeno indicou apenas uma tendência, sem que se pudessem identificar valores significativos dessa possível ineficiência sobre o processo fotossintético. Isso porque, em primeiro lugar, a variabilidade da eficiência quântica entre as diferentes repetições dos dois grupos de plantas analisados foi muito pequena (vide Capítulo I); em segundo lugar, quando analisadas as possíveis razões fisiológicas que de fato constatariam a ocorrência de uma ineficiência no processo de captura da energia luminosa, ou de transferência dessa energia, ou no processo de carboxilação, ou ainda, problemas de ordem estomática, não se verifica qualquer correlação entre α e $P_{N(max)}$, α e E_C ou α e L_S (Tabela 3).

A capacidade adaptativa das plantas às diferentes quantidades de radiação solar incidente é variável. Existem plantas que se desenvolvem somente sob condições de plena luz solar (como a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa) e outras sob condições de sub-bosque, na penumbra (com cerca de 10% da radiação fotossinteticamente ativa dos ambientes expostos). Existem, também, aquelas que podem migrar de um ambiente a outro, dentro de certos limites. Inclusive, dentro de uma única planta, podem existir condições de disponibilidade de luz extremamente

distintas, o que determina diferenças entre as características anatômicas e fisiológicas de suas próprias folhas no dossel (Larcher, 1995).

De maneira geral, sob o ponto de vista anatômico, as folhas de plantas de sol apresentam menor área total do limbo foliar e maior espessura, maior quantidade de cloroplasto por área foliar, porém de menor tamanho e maior densidade estomática em comparação às de sombra. Sob o ponto de vista fisiológico, se verificam maiores teores de clorofila e menores teores de Rubisco, nas plantas de sombra em comparação com as de sol (Larcher, 1995; Ishii, 1998; Taiz e Zeiger, 1998).

Em geral, as plantas absorvem mais luz do que a que efetivamente necessitam para o processo fotossintético, até mesmo pelo fato de que suas alternativas nesse sentido são mínimas. Esse excedente contribui para a formação de radicais livres que comprometem a integridade das membranas, um processo degenerativo denominado foto-oxidação. O ciclo das xantofilas se apresenta, nesse contexto, como um mecanismo mitigador dos efeitos do excedente energético. A síntese de zeaxantina a partir da violaxantina, por um processo enzimático de de-epoxidação, ocorre sempre quando a quantidade de fótons absorvida excede os requerimentos atuais do metabolismo em curso. Quando a situação se normaliza, ocorre o fenômeno inverso, com a epoxidação enzimática da zeaxantina para violaxantina (Pfündel e Bilger, 1994).

Um dado muito interessante observado nas plantas de Urucum é o de que nas folhas das plantas dessa espécie, os teores de carotenóides apresentam-se muito elevados, mesmo quando em comparação com os de espécies que se utilizam do ciclo das xantofilas como mecanismo de mitigação do estresse foto-oxidativo, como é o caso do Café (Oliveira et al., 2002).

A síntese de bixina ocorre na testa das sementes do Urucum, como ficou evidenciado recentemente pelo trabalho desenvolvido por Jako et al. (2002). Assim, é nas sementes onde principalmente se encontra armazenada a bixina e daí o próprio valor comercial dessa planta. Considerando que não foram encontrados registros de um possível transporte de carotenos nas plantas tanto dos frutos e, mais especificamente, das sementes para as folhas quanto de folhas para frutos, tal aspecto suscita uma investigação mais detalhada que permita esclarecer se algum tipo de transporte de carotenos poderia acontecer ou se a bixina também poderia ser sintetizada em outros órgãos da planta como as folhas. Nesse sentido, a bixina e outros carotenos poderiam contribuir ao alto teor de carotenóides encontrados nas folhas de Urucum.

Os teores de bixina presentes nas sementes não se correlacionaram com as variáveis e os parâmetros relacionados com a capacidade fotossintética das plantas (Tabela 2). Essa ausência de correlação direta indica que o metabolismo da bixina envolve vários processos além da produtividade primária. Sendo assim, quaisquer que sejam as variações que esses outros processos possam vir a ter, isso influenciará a produtividade econômica dessa espécie.

Sob o ponto de vista teórico, esperava-se alguma correlação significativa entre os parâmetros e as variáveis associadas às respostas das taxas fotossintéticas à luz e à concentração intercelular de CO₂. Entretanto, para as plantas de Urucum analisadas, essa correlação não foi direta (Tabela 3). Os ajustes metabólicos relacionados ao aproveitamento dos recursos disponíveis são complexos e variáveis no tempo e no espaço. Nesse sentido, sobretudo pelo fato de que as plantas de Urucum não constituem um conjunto homogêneo, mesmo dentro dos grupos classificados de acordo com aspectos fenotípicos, devido sua característica fundamental de ser uma planta de polinização cruzada, as correlações esperadas não necessariamente se evidenciam claramente.

Conclusões

Os dois grupos de plantas analisados, o com fruto verde pilosos e o com fruto avermelhado piloso, não apresentaram diferenças nos seus teores de seus pigmentos cloroplastídicos, bem como nos teores de bixina presentes nas sementes.

A análise pontual das variáveis relacionadas com o processo fotossintético parece não ser suficiente para evidenciar algum padrão que sinalize para uma relação causal entre o teor de pigmentos cloroplastídicos e a capacidade de resposta das plantas à luz e ao CO₂.

Aparentemente, a crescente ineficiência na utilização da energia luminosa a medida que aumentam os níveis das clorofilas *a*, *b* e totais, caracterizada pela correlação negativa entre α , por um lado, e C_a , C_b e C_{tot} , por outro, não representa um problema fisiológico real para as condições em que o experimento foi desenvolvido, dado a que α não se correlaciona com $P_{N(max)}$, E_C ou L_S .

Os teores de carotenóides totais presentes nas folhas das plantas de Urucum são elevados em comparação com os de outras espécies, o que suscita alguma especulação acerca da possível existência de mecanismos de transporte de carotenos ou sobre a presença de síntese de bixina e/ou outros carotenos nas folhas dessa espécie.

Referências Bibliográficas

- Boordman, N.K. 1997.** Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **28**:355-377.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000.** Photosynthesis. **In:** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (B.B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, Eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp. 568-629.
- Franco, C.F. de O.; Silva, F. de C.P. da; Cazé Filho, J.; Barreiro Neto, M.; São José, A.R.; Rebouças, R.N.H.; Fontinelli, I.S.C. 2002.** *Urucuzeiro. Agronegócios de Corantes Naturais*. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A., João Pessoa. 120 p.
- Gonçalves, J.F. de C.; Marengo, R.A.; Vieira, G. 2001.** Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **13**:149-157.
- Ishii, R. 1998.** Leaf/canopy photosynthesis and crop productivity. **In:** *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (A.S. Raghavendra, Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 215-225.
- Jako, C.; Coutu, C.; Roewer, I.; Reed, D.W.; Pelcher, L.E.; Covello, P.S. 2002.** Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, **163**:141-145.
- Larcher, W. 1995.** Carbon utilization and dry matter production. **In:** *Physiological Plant Ecology* (W. Larcher). Springer, Berlin. pp. 57-166.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **In:** *Methods in Enzymology* (L. Packer, R. Douce, Eds.), **148**:350-382.
- Loomis, R.S. e Connor, D.J. 1992.** Agricultural systems. **In:** *Crop Ecology: Productivity and Management in Agricultural Systems* (R.S. Loomis, D.J. Connor). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 3-31.
- Morais, O.M.; São José, A.R.; Rebouças, T.N.H.; Ataíde, E.M. 1999.** Mejoramiento genético del achiote en Brasil. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **3**:109-111.
- Morishige, D.T. ; Dreyfuss, B.W. 1998.** Light-harvesting complexes of higher plants. **In:** *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (A.S. Raghavendra, Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 18-28.
- Oliveira, J.G. de; Alves, P.L.C.A.; Magalhães, A.C. 2002.** The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastidic pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **14**:95-104.

- Pfündel, E. ; Bilger, W. 1994.** Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research*, **42**:89-109.
- Sandmann, G. ; Scheer, H. 1998.** Chloroplasts pigments: chlorophylls and carotenoids. **In:** *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (A.S. Raghavendra, Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 44-57.
- SAS Institute Inc. 1990.** *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed., v. 2, SAS Institute, Cary. 796 p.
- São José, A.R.; Mascarenhas, J.M.O.; Stringheta, P.C.; Rebouças, T.N.H.; Oliveira, V.P. de. 1999.** Cultivo del achiote (*Bixa orellana*) en Brasil. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **3**:113-119.
- Stringheta, P.C.; Mascarenhas, J.M.O.; Pontes, L.V.; Silva, J.N.da; Reis, F.P. (1999).** Determinação do teor de bixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **3**: 47-52.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 1998.** Photosynthesis: physiological and ecological considerations. **In:** *Plant Physiology* (L. Taiz, E. Zeiger, Eds.). Sinauer Associates, Sunderland. pp. 227-249.
- Young, A. 1991.** The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Plant Physiology*, **83**:705-708.

CAPÍTULO III

Caracterização de idioblastos e detecção de bixina em folhas de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Resumo

Folhas de *Bixa orellana* L. apresentaram como característica particular uma grande presença de idioblastos ramificados os quais permaneceram pigmentados mesmo após o processo de diafanização. A reação com Sudan IV confirmou a presença de substâncias lipofílicas nos idioblastos o que permite sugerir que alguns desses compostos sejam carotenóides tais como a bixina. A cromatografia em camada fina permitiu separar um total de 14 bandas a partir dos extratos de folhas de Urucum analisados. A banda correspondente à bixina com um Rf de 0,44 esteve presente em todos os extratos analisados tanto de material coletado em campo quanto de material obtido *in vitro* o que confirma a presença de bixina nas folhas de Urucum.

Palavras-chaves: *Bixa orellana* L., Urucum, bixina, idioblastos.

Introdução

A importância econômica do Urucum (*Bixa orellana* L) pode ser medida pelo fato de que a bixina, pigmento extraído das sementes, estar classificada como o segundo corante natural de maior uso como aditivo na indústria (Bouvier et al., 2003). A bixina é um carotenóide com dois grupos carboxílicos, um dos quais está esterificado, a norbixina derivada da bixina por hidrólise do grupo éster (Kiokias e Gorgon, 2003). Atualmente, ambas são empregadas em produtos alimentícios, cosméticos, fármacos e tintas (Nazaré, 1994; Franco et al., 2002). Como o principal uso dos extratos de Urucum é na indústria alimentícia a maioria dos estudos publicados tem se concentrado na otimização dos protocolos de extração ou na determinação dos seus pigmentos nos alimentos (Kovary, et al., 2001).

O interesse crescente na espécie se vê refletido nos trabalhos publicados nos últimos anos voltados para o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para o estudo e elucidação do metabolismo dos carotenóides, ampliando as possibilidades de sua produção em espécies diferentes, incluindo microrganismos (Narváez et al., 2001; Jako et al., 2002; Bouvier et al., 2003; Zaldívar-Cruz et al., 2003, Camara e Bouvier, 2004), no aperfeiçoamento das técnicas de propagação *in vitro* (D'Souza e Sharon, 2001, Paiva Neto et al., 2003) e para a obtenção de linhas celulares de Urucum (Cuartas, 2003).

Além disso, existe um interesse crescente, na medicina, relacionado com os benefícios de terpenóides e de outros compostos produzidos pelas plantas para evitar o estresse oxidativo (Grassmann et al., 2002; Lyng, 2005). Assim, também estão sendo estudados os efeitos da bixina e da nor-bixina como auxiliares no tratamento de algumas doenças graças ao seu poder antioxidante (Silva et al., 2001; De Oliveira et al., 2003; Agner et al., 2004) e antimicrobiano (Fleischer et al., 2003). Considere-se também que as plantas de Urucum, e em particular as folhas, possuem outros compostos diferentes da bixina que podem apresentar efeitos positivos para auxiliar o tratamento de algumas doenças como relatado na medicina tradicional (Fleischer et al., 2003; Caraballo et al., 2004). Devido às propriedades antimicrobianas da bixina e da norbixina (Fleischer et al., 2003) e o interesse na transformação genética da espécie (Zaldívar-Cruz et al., 2003), a existência dessas substâncias em explantes diversos (cotilédones, folhas e segmentos de epicótilo e hipocótilo) poderia comprometer o sucesso no estabelecimento

ou a eficiência de protocolos de transformação genética de Urucum, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

O presente trabalho teve como objetivo contribuir ao conhecimento da anatomia foliar de Urucum e, em especial, verificar a presença de bixina em folhas tanto de material coletado em campo quanto de material cultivado *in vitro*.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram coletadas folhas de plantas adultas de Urucum crescendo no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, folhas obtidas a partir de plântulas germinadas *in vitro* e folhas geradas a partir de epicótilos cultivados *in vitro* no laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). O meio de cultura foi composto pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B₅ (Gamborg et al., 1968), 87,6 mM sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, Fitagel (Sigma) a 0,28 % (p/v) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Para o cultivo dos epicótilos, o meio de cultura também foi suplementado com 4,56 µM Zeatina.

Estudos Anatômicos

A diafanização das folhas foi realizada segundo a metodologia descrita por Johansen (1940) com algumas modificações. As folhas completas do material obtido *in vitro* e segmentos das folhas coletadas em campo foram colocadas numa solução de NaOH à 10% durante cerca de 18 horas, a seguir foram lavadas com água destilada várias vezes antes de ser colocadas numa solução de hipoclorito de sódio comercial à 20%, até alcançar a clarificação do material e, então, foram novamente lavadas com água destilada para retirar o excesso do reagente. Parte do material foi corada com safranina e azul de toluidina, e posteriormente todo o material foi montado em lâminas semipermanentes com gelatina.

Cortes transversais de material fresco foram utilizados para detectar a presença de substâncias lipofílicas utilizando como reagente histoquímico Sudan IV (Gerlach, 1984) e montados também em lâminas semipermanentes.

O processamento das folhas e análise e a fotografia do material foram realizados utilizando-se microscópio de Luz (Olympus AX70, Tokyo, Japão) conectado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo, Tokyo, Japão), no laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

*Obtenção dos Extratos Foliare*s

A obtenção dos extratos para a realização da cromatografia foi a mesma descrita no Capítulo II, para a determinação do teor de pigmentos cloroplastídicos, feita de acordo com o método proposto por Lichthenthaler (1987), utilizando acetona 80% para a extração.

Uma vez obtidos os extratos e sem qualquer diluição adicional, sob condições de penumbra, estes foram borbulhados com N₂ gasoso para a concentração das amostras e, imediatamente, armazenados à 5°C na geladeira, em vidros escuros, até a realização da cromatografia.

Cromatografia em Camada Fina

Extratos obtidos a partir de folhas maduras (totalmente expandidas) e de folhas jovens de plantas de Urucum, crescendo em condições de campo, assim como aqueles obtidos de folhas *in vitro* foram aplicados com o auxílio de capilares numa placa de sílica gel G-60 MERCK (20 x 20 cm) acima do nível da fase móvel dentro da cuba.

O padrão de bixina utilizado foi o corante A-8000 da Christian Hansen (bixina 8 ± 0,2 %) o qual foi diluído 1:1 com acetona 80% e aplicado diretamente na placa cromatográfica.

A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetona (10 + 9), selecionada entre as descritas por Mínguez-Mosquera et al. (1995). Uma vez que a câmara de vidro ficou saturada com a fase móvel, a placa com as amostras e o padrão foi introduzida, tampando-se a câmara cuidadosamente com uma placa de vidro a qual foi selada com vaselina. A cromatografia foi realizada em sala com temperatura de 25°C até a frente do solvente atingir cerca de dois centímetros do final da placa. Após a secagem das placas, foram identificadas as bandas separadas e determinado o fator de retenção (R_f) das mesmas.

Resultados e Discussão

Anatomia Foliar

As folhas diafanizadas de Urucum apresentaram como característica particular uma grande presença de idioblastos ramificados tanto nas folhas obtidas de material de campo como de material *in vitro* os quais apresentaram uma coloração própria mesmo após o processo de diafanização (Figura 1) aparentemente encontram-se localizados no mesofilo e poderiam corresponder às células secretoras mencionadas por Metcalf e Chalk (1950).

O termo idioblasto, ainda hoje, é mais utilizado por conveniência que por conotações morfológicas ou fisiológicas específicas e agrupa diversos tipos de células localizadas no parênquima entre as quais se pode mencionar: idioblastos secretores tais como células contendo óleo, mucilagem, taninos, cristais e látex; traqueo-idioblastos presentes em algumas euforbiáceas e idioblastos esclerenquimatosos que seriam os próprios esclereídeos que representam o mais bizarro e polimórfico grupo (Foster, 1955).

Os idioblastos observados nesse estudo se apresentaram volumosos e irregularmente ramificados, sendo possível observar gotículas de óleo no interior dos mesmos (Figura 1C), às quais poderiam estar associadas substâncias lipofílicas, tais como os carotenóides. Segundo Solereder (1908), células secretoras alongadas, tubulares ou ramificadas são encontradas nos gêneros *Amoreuxia*, *Xymalus*, *Cocholospermum* e *Bixa* assim como cavidades secretoras aparentemente lisígenas em *Amoreuxia*, *Sphaerosepalum*, *Cocholospermum* e *Bixa* as quais aparecem como manchas transparentes ou estrias finas nas folhas.

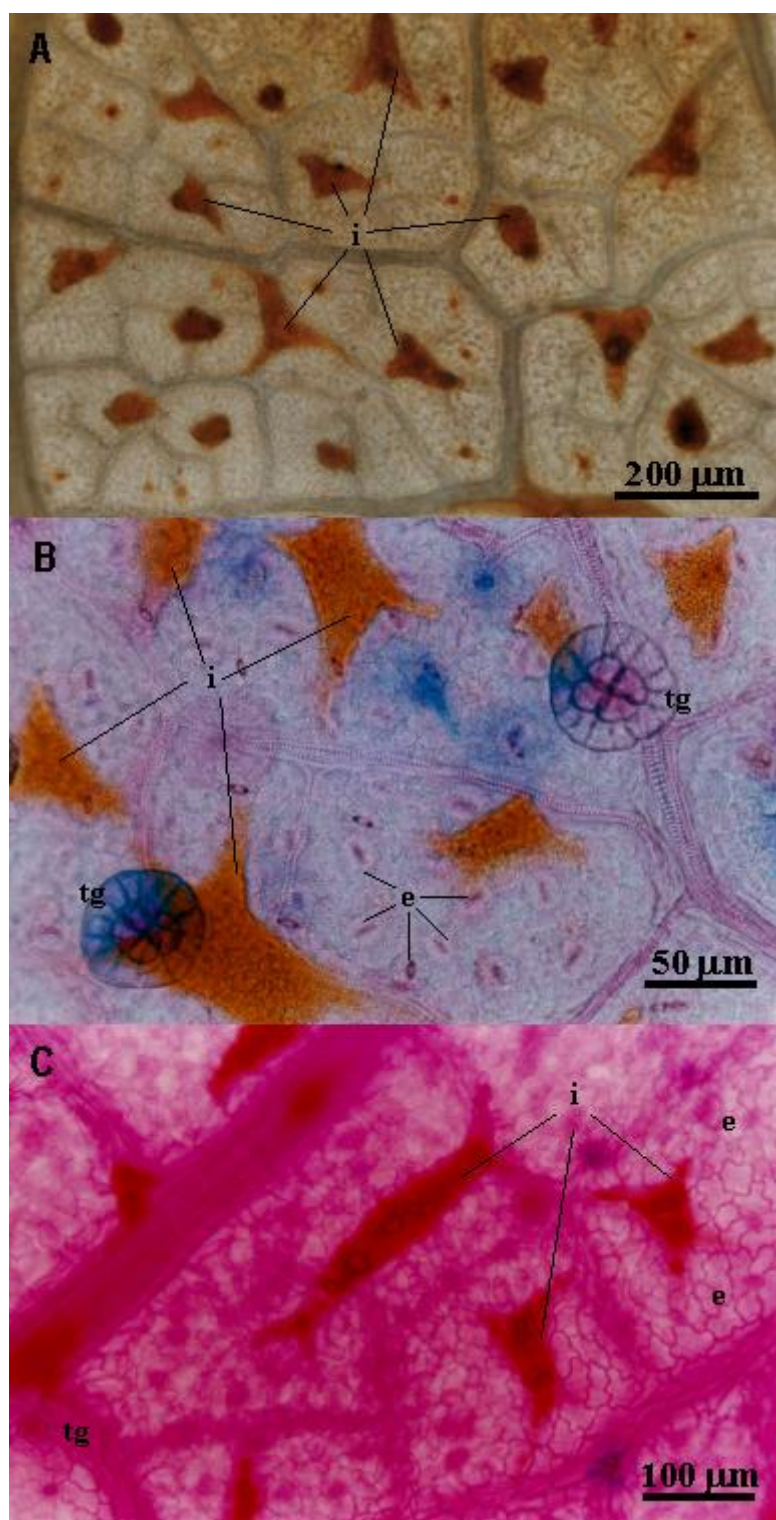


Figura 1 – Folhas diafanizadas de Urucum (*Bixa orellana* L.). A. Folha coletada em campo após diafanização B. Folha obtida *in vitro* corada com Safranina e Azul de Astra. C. Idioblastos com gotículas de óleo. Idioblastos (i), estômatos (e) e tricomas glandulares (tg).

Nos cortes transversais do material fresco pode ser observada uma epiderme uniestratificada a qual possui estômatos anomocíticos (Figura 2) da mesma forma que o tipo encontrado nas famílias Rubiaceae e Cruciferae (Solereeder, 1908; Metcalf e Chalk, 1950). Tricomas glandulares com uma cabeça em forma de disco constituída por várias células divididas exclusivamente por paredes verticais e suportada por uma base curta (Figura 1 e 2). No entanto, Solereeder (1908) cita a presença de tricomas ramificados, além dos tricomas glandulares.

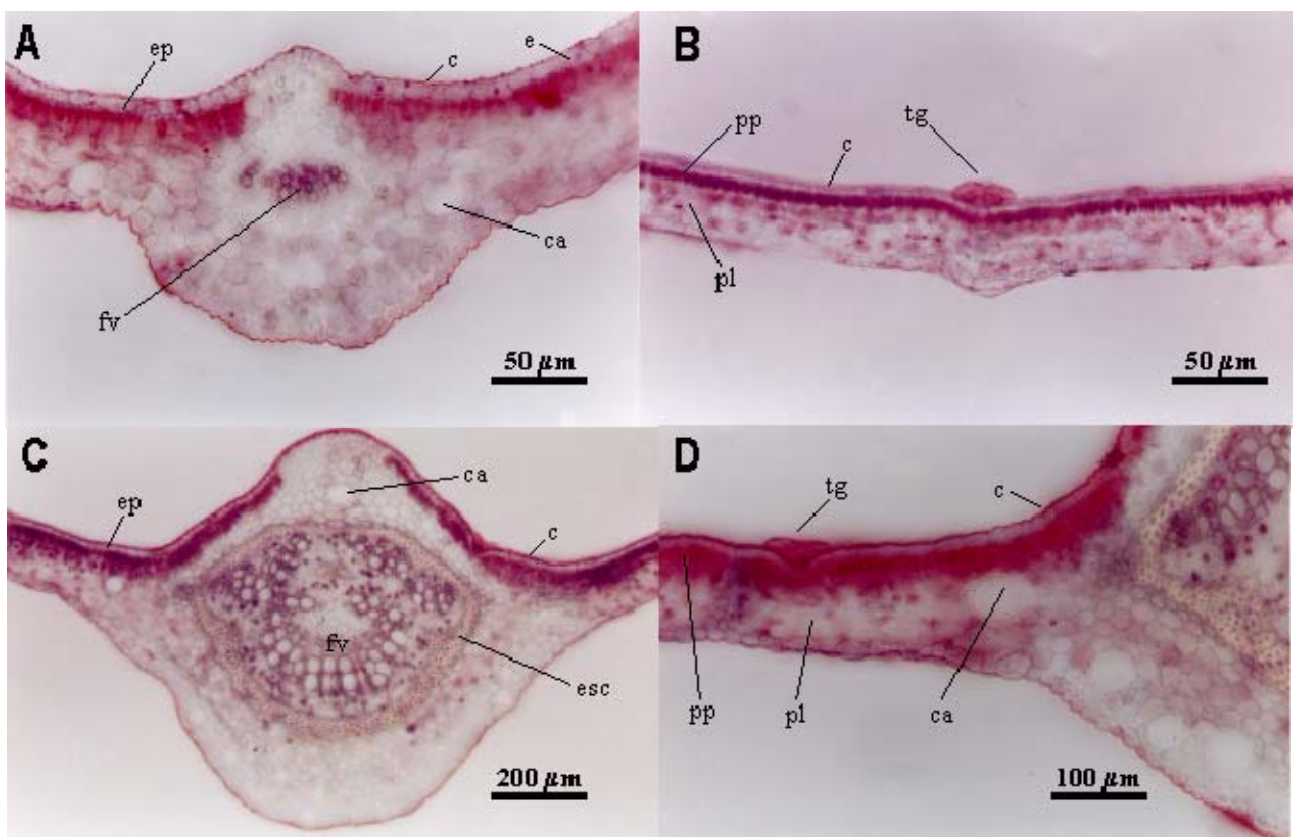


Figura 2 – Cortes transversais de folhas de Urucum (*Bixa orellana* L.) corados com Sudan IV. Nervura de material cultivado *in vitro* (A); mesofilo de material cultivado *in vitro* (B); nervura de material adulto (C); mesofilo de material adulto (D). Detalhes da epiderme (ep), canais secretores (cs), cutícula (c), estômato (e), feixes vasculares (fv), parênquima paliçádico (pp), parênquima lacunoso (pl), tricoma glandular (tg) e esclerênquima (esc).

A estrutura das folhas é tipicamente dorsiventral com uma camada de parênquima paliçádico voltada para a face adaxial e o parênquima lacunoso próximo da face abaxial da folha (Figura 2). Os feixes vasculares são do tipo colateral. Canais secretores rodeados por um epitélio de pequenas células encontram-se dentro do tecido parenquimático, tanto no mesofilo quanto nas nervuras como descrito por Metcalf e Chalk (1950), nas folhas obtidas em ambos os tipos de material analisado (Figura 2).

As folhas oriundas de cultivo *in vitro* apresentam cutícula e feixe vasculares pouco desenvolvidos, ausência de esclerênquima, bem como parênquima rico em espaços intercelulares em comparação às folhas provenientes do campo (Figura 2), características comuns em materiais provenientes de condições *in vitro* (Majada et al., 2000; Iarema, 2004).

A reação com Sudan IV, evidenciou a presença de substâncias lipofílicas, como é o caso dos carotenóides, dentro dos idioblastos localizados no parênquima logo abaixo da epiderme, bem como no interior dos tricomas glandulares (Figura 2). Ciscar (1965) propôs a utilização de extratos de sementes de Urucum, reconhecidamente ricos em bixina, como corante em estudos histológicos para identificar substâncias lipofílicas tais como colesterol e gorduras neutras, entre outros.

Análise Cromatográfica

Após a secagem das placas, foi possível observar a presença de várias manchas, a partir dos diferentes extratos. No total foram identificadas 14 bandas (Figura 3) e houve variações na intensidade das mesmas, o que reflete as diferenças no teor de tais compostos entre os extratos e o caráter meramente qualitativo desta técnica. O valor do fator de retenção (R_f) das bandas variou de 0,09 para a banda número 1 a 0,82 para a banda 14.

A banda de número 6, esteve presente em todos os extratos com um R_f de 0,44, identificou a bixina, e foi a única banda presente a partir da solução utilizada como padrão (Figura 3), o arraste observado na coluna do padrão indica que a sua concentração está bem acima daquela encontrada nos extratos das folhas de Urucum analisados. As demais bandas podem representar outros compostos tipo carotenóides ou apocarotenóides e as bandas 10 e 11 poderiam corresponder às clorofilas (Figura 3). Portanto, é recomendável realizar estudos com outras técnicas mais refinadas como a

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e espectrometria de massa (EM) que permitam a identificação dos compostos presentes nas folhas de Urucum.

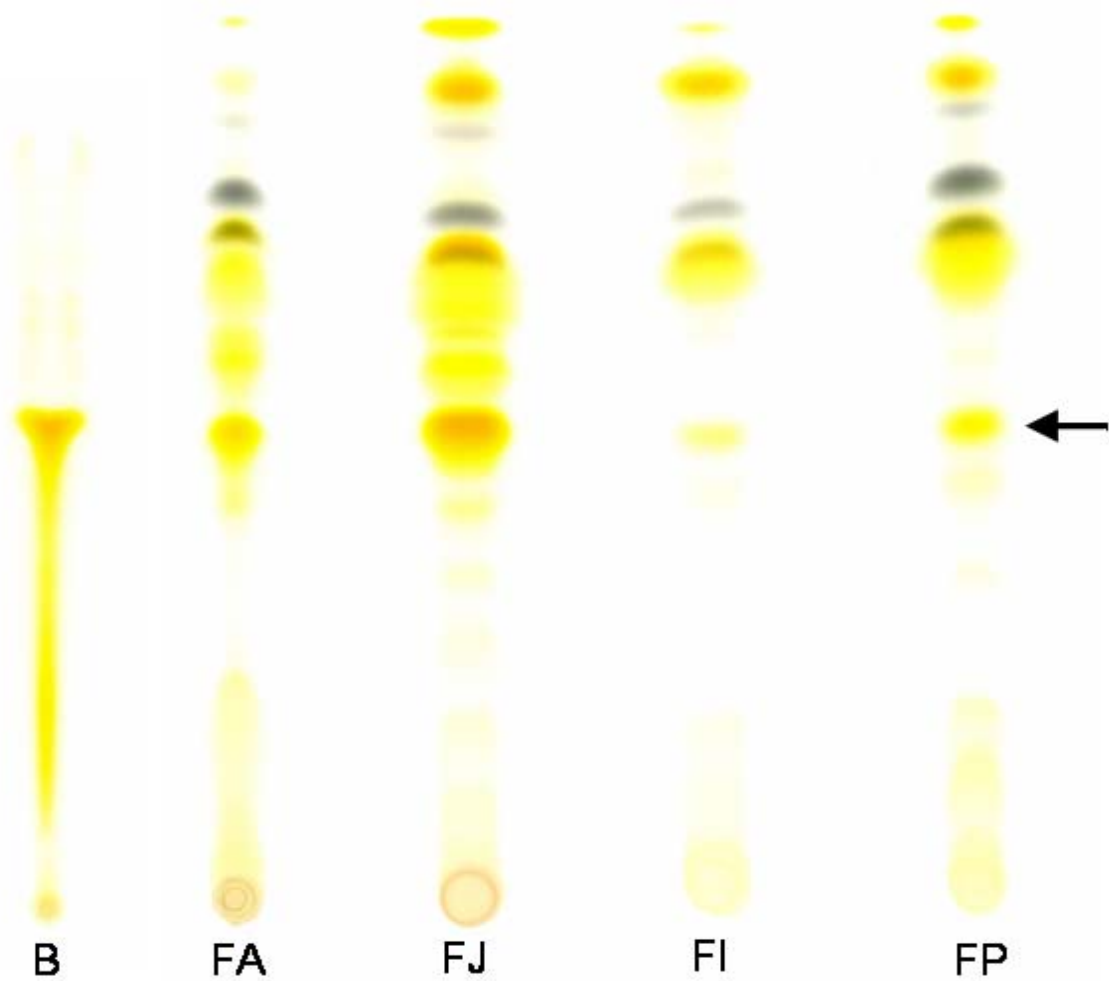


Figura 3 – Cromatograma de extratos foliares de *Bixa orellana* L. Padrão de bixina (corante Christian Hansen A-8000) (B), folhas adultas (FA), folhas jovens (FJ), folhas obtidas *in vitro* (FI), folhas de plântulas *in vitro* (FP). A seta indica a banda correspondente à bixina.

A partir de extratos obtidos de sementes de Urucum já foram identificados vários apocarotenóides (Mercadante et al, 1997). Nas plantas, os carotenóides são sintetizados e normalmente seqüestrados em plastídios como constituintes lipofílicos C₄₀; porém, eles podem ser modificados pela ação de várias di-oxigenases e a partir do rompimento do esqueleto dos carotenóides os apocarotenóides são formados os quais poderiam ter um importante papel biológico (Câmara e Bouvier, 2004).

Os extratos das folhas coletadas em campo apresentaram a maior quantidade de bandas. As folhas jovens apresentaram todas as bandas enquanto que, nas folhas adultas, só não foi detectada a banda correspondente à 4. Nos extratos de folhas provenientes de condições *in vitro* um menor número de bandas foi detectado e, em alguns casos, estas foram menos evidentes (Figura 3).

Souza (2000), relatou um R_f médio de 0,83 ao utilizar uma mistura de clorofórmio-acetona-ácido acético, como fase móvel, para a detecção de bixina em extratos obtidos a partir de sementes de diferentes variedades de Urucum. Segundo Takahashi (1987), extratos lipossolúveis de Urucum produziram duas ou quatro manchas vermelhas ou amarelas que, à semelhança do presente trabalho, não necessitaram revelador. Dendy (1966) citado por Souza (2000), observou a presença de várias manchas, sendo que a mais intensa representaria a *cis*-bixina enquanto que a mais clara corresponderia à *trans*-bixina.

Os teores de carotenóides encontrados nas folhas das plantas adultas (Capítulo II) e em folhas de ápices caulinares de Urucum cultivados *in vitro* (Capítulo IV) foram muito elevados comparativamente com espécies que, reconhecidamente, apresentam o ciclo das xantofilas como um mecanismo mitigador do estresse foto-oxidativo, a exemplo do cefeiro, que apresenta esses teores ao redor dos 22,6 mg kg⁻¹ (Oliveira et al., 2002).

A presença de flavonóides, saponinas, compostos fenólicos e açúcares redutores também tem sido reportada em folhas de Urucum (Fleischer et al., 2003). Ishwareno foi isolado a partir de óleo extraído de folhas de Urucum contendo também outros sesqui e mono terpenos (Lawrence e Hogg, 1973).

A partir de idioblastos de frutos de *Persea americana* Mill. foi isolado óleo contendo alcalóides, sesquiterpenos e outros terpenos; dentre esses foram identificados um dieno e um trieno com capacidade antifúngica (Domergue et al., 2000).

No presente estudo, as observações das folhas de Urucum ao microscópio revelaram a presença idioblastos, no interior dos quais se pode identificar substâncias

lipofílicas, como os carotenóides. Isso suscita a existência de uma rota de síntese de bixina inédita nas folhas, já que até a presente data, os estudos têm sido dirigidos especificamente às sementes, devido a sua importância econômica, como pode ser observado no recente trabalho realizado por Jako et al. (2002), em que se demonstra a síntese de bixina na testa das sementes. Adicionalmente, esse trabalho reforça a idéia de que os elevados teores de carotenóides totais presentes nas folhas de Urucum se devam, provavelmente em parte, à presença de bixina e talvez de outros carotenóides não identificados neste trabalho.

Conclusões

As folhas de Urucum apresentaram como característica anatômica particular uma grande presença de idioblastos ramificados. A epiderme é uniestratificada com estômatos do tipo anomocíticos e tricomas glandulares. A estrutura das folhas é tipicamente dorsiventral, apresentando canais secretores junto ao tecido parenquimático. Ao contrário de folhas provenientes do campo, aquelas oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram cutícula e feixe vasculares pouco desenvolvidas com ausência de esclerênquima.

A reação, com Sudan IV confirmou a presença de substâncias lipofílicas dentro dos idioblastos localizados logo abaixo da epiderme.

Por outro lado, a cromatografia em camada fina permitiu separar 14 bandas, sendo a de número seis correspondente à bixina, a qual esteve presente em todos os extratos analisados tanto de material coletado em campo quanto de material obtido *in vitro*, o que permite confirmar a presença de bixina nas folhas de Urucum.

Referências Bibliográficas

- Agner, A.R.; Barbisan, L.F.; Scolastici, C.; Salvadori, D.M.F. 2004.** Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, **42**:1687-1693.
- Bouvier, F.; Dogbo, O.; Câmara, B. 2003.** Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, **300**:2089-2091.
- Camara, B.; Bouvier, F. 2004.** Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **430**:16-21.
- Caraballo, A.; Caraballo, B.; Rodríguez-Acosta, A. 2004.** Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southern Venezuelan Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **37**:186-188.
- Ciscar, F. 1965.** Achiotin, an extract of Achiote seeds (*Bixa orellana* L.) as a histologic stain for lipids. *Stain Technology*, **40**:249-251.
- Cuartas C., S. 2003.** *Estudio preliminar para la obtención in vitro de células de Bixa orellana* L. (Achiote). Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, Colombia. Tesis de Maestría en Microbiología. 106 p.
- De Oliveira, A.C.A.X.; Silva, I.B.; Manhaes-Rocha, D.A. 2003.** Introduction to liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **36**:113-118.
- Dendy, D.A.V. 1966.** The assay of annatto preparations by thinlayer chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **17**:75-76.
- Domergue, F.; Helms, G.L.; Prusky, D.; Browse, J. 2000.** Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry*, **54**:183-189.
- D'Souza, M.C.; Sharon, M. 2001.** In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **37**:168-172.
- Fleischer, T.C.; Ameade, E.P.K.; Mensah, M.L.K.; Sawyer, I.K. 2003.** Antimicrobial activity of leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, **74**:136-138.
- Franco, C.F. de O; Silva, F. de C.P.; Filho, J.C.; Neto, M.B.; São José, A.R.; Rebouças, T.N.H; Fontinelli, I.S.C. 2002.** *Urucuzeiro - Agronegócio de Corantes Naturais*. EMEPA-PB. João Pessoa, PB. 120 p.
- Foster, A.S. 1955.** Plant idioblast: Remarkable examples of cell specialization. *Protoplasma*, **46**:184-191.
- Gamborg, O. L; Miller, R. A.; Ojima, K. 1968.** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, **50**:151-158.

- Gerlach, D. 1984.** *Botanische mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 311 p.
- Grassmann, J.; Hippeli, S.; Elstner, E.F. 2002.** Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**:471-478.
- Iarema, L. 2004.** *Lippia filifolia* Mart. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*: anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado. 85 p.
- Jako, C.; Coutu, C.; Roewer, I.; Reed, D.W.; Pelcher, L.E.; Covello, P.S. 2002.** Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, **163**:141-145.
- Johansen, D.A. 1940.** *Plant Microtechnique*. Mc Graw-Hill, New York. 523 p.
- Kiokias, S.; Gordon, M.H. 2003.** Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*, **83**: 523-529.
- Kovary, K.; Lourain, T.; Silva, C.; Albano, F.; Pires, M.B.; Lage, S.L.; Felzenswalb, I. 2001.** Biochemical behavior of norbixin during *in vitro* DNA damage induced by reactiveoxygen species. *British Journal of Nutrition*, **85**:431-440.
- Lawrence, B.M.; Hogg, J.W. 1973.** Ishwarane in *Bixa orellana* leaf oil. *Phytochemistry*, **12**:2995.
- Lichthenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology* (L. Packer, R. Douce, Eds.). **148**:350-382.
- Lyng, S.M.O.; Passos, M.; Fontana, J.D. 2005.** Bixin and α -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process Biochemistry*, **40**:865-872.
- Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Pfander, H. 1997.** Isolation and identification of new apocarotenoids from Annatto. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**:1050-1054.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy With Notes on Economic Uses*. Clarendon Press, Oxford. vol. 1. pp. 87-91.
- Majada, J.P.; Tadeo, F.; Fal, M.A.; Sánchez-Tamés, R. 2000.** Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**: 207-214.
- Mínguez-Mosquera, M.I.; Hornero-Méndez, D.; Garrido-Fernández, J. 1995.** Detection of Bixin, Lycopene, Canthaxanthin, and B-Apo-8'-Carotenal in products derived from red pepper. *Journal of AOAC International*. **78**:491-496.

- Murashige, T.; Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-497.
- Narváez, J.A.; Flores-Perez, P.; Herrera-Valencia, V.; Castillo, F.; Ku-Cauich, R.; Canto-Canche, B.B.; Santana-Buzzy, N.; Rivera-Madrid, R. 2001.** Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in *Bixa orellana* L. *HortScience*, **36**:982-986.
- Nazaré, R.F.R. 1994.** Potencialidade de plantas amazônicas produtoras de corantes naturais. In: *Congresso Brasileiro de Corantes Naturais, 2, Simpósio Brasileiro de Urucum, 2. Anais...* Belém-PA. pp. 18.
- Oliveira, J.G. de; Alves, P.L.C.A.; Magalhães, A.C. 2002.** The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **14**:95-104.
- Paiva Neto, V.B.; Mota, T.R.; Otoni, W.C. 2003.** Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **75**:159-167.
- Silva, C.R. da; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M. de L.P. 2001.** Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*, **43**:561-566.
- Solereeder, H. 1908.** *Systematic Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford, vol. I. pp 112-113.
- Souza, E.C. 2000.** *Estudo Químico e Físico-Químico dos Pigmentos do Urucum Utilizando Metodologia Simplificada de Extração*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. Tese de Mestrado Ciência de Alimentos. 45 p.
- Takahashi, M. 1987.** *Monografia de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade*. Instituto Adolf Lutz, São Paulo. 2ª ed. 118 p.
- Zaldívar-Cruz, J.M.; Ballina-Gómez, H.; Guerra-Rodríguez, C.; Avilés-Berzunza, E.; Godoy-Hernández, G.C. 2003.** *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the *gus* reporter gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **73**:281-284.

CAPÍTULO IV

Efeitos de diferentes densidades de fluxo de luz sobre os teores de pigmentos cloroplastídicos, a fluorescência e a atividade de enzimas do estresse foto-oxidativo em ápices caulinares de Urucum (*Bixa orellana* L.) cultivados *in vitro*

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes densidades de fluxo de luz nas respostas ao estresse foto-oxidativo, mais especificamente, na variação dos teores de carotenóides totais e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT) e peroxidases (POD) em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato. Verificou-se que os teores de clorofilas *a* e *b* diminuíram em 95,4% e 56,8% com o incremento na densidade de fluxo de luz de 50 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente; sem alteração nos teores de carotenóides totais, cuja média foi de 766 mg kg^{-1} . A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase diminuiu com o tempo de exposição à luz, independentemente da densidade de fluxo. Por outro lado, a atividade das peroxidases que aos 30 dias de exposição foi indiferente à densidade de fluxo, passou de 7,2 para 11,8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, quando a densidade de fluxo aumentou de 50 para 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; respectivamente. Esses resultados, apesar dos elevados níveis de carotenóides totais, sugerem que os explantes de Urucum não apresentam um mecanismo eficiente e mitigador do estresse foto-oxidativo, ficando foto-inibidos com a densidade de fluxo de luz de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando valores da relação F_v/F_m iguais a 0,726 e 0,581 aos 30 e 45 dias de exposição, respectivamente.

Palavras-chaves: *Bixa orellana* L., luz, estresse oxidativo, pigmentos cloroplastídicos, fluorescência da clorofila, relação F_v/F_m , catalase, superóxido dismutase, peroxidase.

Introdução

A importância econômica do Urucum pode ser medida pelo fato de que a bixina está classificada como o segundo corante natural utilizado como aditivo na indústria (Bouvier et al., 2003). O interesse crescente nesta espécie se vê refletido nos trabalhos publicados nesses últimos anos visando ao aperfeiçoamento das técnicas de propagação *in vitro* (D'Souza e Sharon, 2001, Paiva Neto et al., 2003 a, b), à obtenção de linhagens celulares (Cuartas, 2003) e ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para o estudo do metabolismo dos carotenóides (Narváez et al., 2001; Jako et al., 2002; Bouvier et al., 2003; Zaldívar-Cruz et al., 2003).

Além disso, existe um interesse crescente na medicina relacionado com os benefícios de terpenóides e de outros compostos produzidos pelas plantas, na prevenção do estresse oxidativo (Grassmann et al., 2002). Assim, também estão sendo estudados os efeitos da bixina e da norbixina como auxiliares no tratamento de doenças graças ao seu poder antioxidante (Silva et al., 2001; De Oliveira et al., 2003).

Justamente por estes motivos, hoje em dia existe uma grande demanda por resultados de pesquisa que auxiliem na elaboração de protocolos de propagação, em especial *in vitro*, dado a que o processo de melhoramento genético da espécie requer dessas ferramentas para a obtenção de material vegetal de alta qualidade.

Dentre os sistemas de propagação *in vitro*, atualmente utilizados, o foto-autotrófico tem despertado grande interesse, tanto por permitir a redução de nutrientes nos meios de cultivo substituindo-os pela promoção do processo fotossintético, como pela consecução de plântulas com maior grau de aclimação em campo (Kozai, 1991; Seon et al., 2000).

Entretanto, as densidades de fluxo de luz que se utiliza em meios de cultivo *in vitro* são muito baixas, pelo fato de que se corre muito risco com problemas de foto-inibição e foto-oxidação em explantes cujas folhas ainda são muito sensíveis e carecem de uma anatomia e bioquímica funcional própria das plantas crescidas em campo.

A escolha da melhor densidade de fluxo de luz para o crescimento dos explantes *in vitro* é geralmente empírica e, em muitos casos, dependente da própria infra-estrutura laboratorial disponível.

Invariavelmente, a exposição dos seres vivos e, em particular das plantas, a condições ambientais adversas leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Este fenômeno ocorre

principalmente em plantas expostas a temperaturas extremas (altas e baixas), altas irradiâncias, seca, exposição a poluentes, luz ultra-violeta e herbicidas (Smallwood et al., 1999). Porém, as plantas apresentam diferentes mecanismos de proteção contra os efeitos nocivos das espécies reativas do oxigênio. Alguns são direcionados a diminuir e outros a evitar a formação de radicais de oxigênio e incluem adaptações anatômicas, como por exemplo, o incremento da espessura cuticular e do albedo foliar; fisiológicas, como os mecanismos fotossintéticos C4 e CAM; e moleculares, como a participação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), as catalases (CAT) e as peroxidases (POD), assim como a presença de moléculas antioxidantes tais como o ácido ascórbico, a glutatona, o tocoferol e os carotenóides (Mittler, 2002). Estes últimos são considerados como um dos mecanismos não enzimáticos mais importantes contra o estresse oxidativo.

Existem muitos trabalhos já realizados elucidando o papel dos carotenóides como protetores de estresses oxidativos, contudo, ainda hoje, o comentário de Bartley e Scolnik (1995) permanece atual, pois a despeito dos avanços obtidos, inclusive com a utilização de mutantes na caracterização dos processos metabólicos envolvendo os carotenóides, muitos assuntos relacionados com as regulações de caráter ambiental e mesmo com o processo de desenvolvimento da planta, entre outros, permanecem obscuros e necessitam de mais pesquisas. Particularmente, a bixina apresenta idêntica capacidade para capturar a energia contida no oxigênio singleto que o β -caroteno, o que sugere que não somente a quantidade de duplas conjugadas presentes na molécula é decisiva ao processo, mas também há que se considerar o grupo funcional e talvez o potencial de oxidação (Mercadante e Pfander, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações nos teores dos pigmentos cloroplastídicos, em particular dos carotenóides, bem como na atividade de enzimas do estresse oxidativo, em ápices caulinares de Urucum cultivados *in vitro* submetidos a diferentes densidades de fluxo de luz, para verificar se estas poderiam predispor os explantes ao estresse foto-oxidativo.

Material e Métodos

Material Vegetal

Ápices caulinares (10-20 mm de comprimento) derivados de epicótilos, obtidos a partir de germinação *in vitro* de sementes de Urucum do tipo Bico de Pato, foram individualizados e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura contendo os sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas do meio B₅ (Gamborg et al., 1968), 87,6 mM sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol e 0,28% (p/v) de Fitagel. Os meios foram suplementados com 4,56 µM Zeatina e tiveram o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 (Paiva Neto et al., 2003a).

O emprego da Zeatina foi estabelecido a partir de um experimento preliminar, no qual se identificaram problemas relacionados à redução no desenvolvimento dos explantes em meio de cultivo desprovido do hormônio.

Condições de Cultivo

Uma vez inoculados, os tubos foram transferidos para a sala de crescimento do laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia. Os epicótilos foram submetidos a três densidades de fluxo de luz (50, 105 e 150 µmol m⁻² s⁻¹), utilizando lâmpadas fluorescentes brancas OSRAM (40W), sendo estas quantificadas com auxílio de um radiômetro (LI-185B, LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Análise dos Pigmentos Cloroplastídicos

Após 30 e 45 dias sob as diferentes densidades de fluxo de luz, o material vegetal foi imediatamente acondicionado em sacos de papel alumínio e congelado em nitrogênio líquido para ser, em seguida, armazenado em freezer a -80°C, até o momento da preparação dos extratos para a determinação do teor de pigmentos cloroplastídicos.

A determinação dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides totais foi feita de acordo com o método proposto por Lichtenthaler (1987), porém, com algumas modificações para adequar o método ao tipo de material vegetal empregado. Os procedimentos foram realizados em um quarto com luz de interferência de baixa irradiância na faixa do verde.

Tomaram-se aproximadamente 30 mg do material vegetal (folhas), os quais foram maceradas com a mesma quantidade de carbonato de cálcio em 500 μ L de acetona 80%. A acetona e demais soluções voláteis com alta pressão de vapor foram dispensadas com a técnica da pipetagem reversa empregando um tempo de espera inicial para permitir suficiente pressão parcial de vapor no interior da câmara da pipeta, antes de serem dispensadas, procedimentos para evitar perda destas soluções.

O material macerado foi transferido quantitativamente para um microtubo de 2 mL, por meio de uma primeira lavagem do cadinho com 500 μ L de acetona 80% e, finalmente, uma segunda e última lavagem com outros 500 μ L de acetona 80% adicionais. Os microtubos com o macerado foram levados à microcentrífuga e centrifugados a 6000 *g* por 10 minutos.

Uma alíquota de 800 μ L do sobrenadante de cada microtubo foi retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 1,5 mL de acetona 80%, para uma primeira diluição do extrato original. Esse tubo de ensaio foi previamente encapado com papel de alumínio para evitar o contato com a luz.

Em seguida, efetuou-se um teste de leitura da absorbância de algumas amostras nos comprimentos de onda de 663,2; 646,8 e 470 nm, empregando-se como branco acetona a 80%, com a utilização de um espectrofotômetro UV-visível (U-2000, Hitashi, Tóquio, Japão).

Quando as absorbâncias alcançaram valores acima da faixa de leitura ideal, que se situa entre 0,2 e 0,8, houve necessidade de se diluir novamente os extratos empregando acetona a 80%.

Atividade Enzimática

O material vegetal foi coletado e armazenado conforme descrito no item anterior, até o momento da preparação dos extratos para a determinação da atividade enzimática.

As atividades das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase foram determinadas em 0,1 g de tecido foliar e 30 mg do antioxidante PVPP. O material foi macerado em 5 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, e EDTA 0,1 mM, num almofariz de porcelana, e centrifugado a 15.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado nos testes enzimáticos. Todo o processo foi realizado a 4°C.

A atividade da peroxidase (POD EC1.11.1.7) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação, a 25°C, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O aumento na absorvância a 420 nm foi medido durante os dois primeiros minutos de reação e utilizado no cálculo da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955).

A atividade da catalase (CAT EC1.11.1.6) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de H₂O₂ 12,5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 a 30°C (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, nos dois primeiros minutos foi medido e utilizado no cálculo da quantidade de H₂O₂ consumida, utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M cm⁻¹ (Anderson et al., 1995).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD EC1.15.1.1), foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,90 mL do meio de reação constituído de metionina 13 mM, azul de ρ-nitro tetrazólio (NBT), 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida numa câmara fechada com o interior revestido com papel alumínio, a qual continha uma lâmpada fluorescente de 15 W. O início da reação se deu pela ligação da lâmpada e o final, após 15 minutos, com o desligamento da mesma. A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pelo incremento na absorvância a 560 nm. Foi preparado um branco contendo o extrato enzimático e mantido no escuro durante os 15 minutos, e outro sem o extrato enzimático e mantido sob iluminação, para 0 e 100% da fotorredução do NBT, respectivamente. A

atividade enzimática foi expressa em unidade SOD, que representa a atividade enzimática capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Análise da Foto-Inibição

A avaliação da foto-inibição foi realizada mediante a análise da relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (relação F_v/F_m), de acordo com Bolhàr-Nordenkampf e Öquist (1993). Para realizar as medidas de fluorescência, foi empregado um fluorômetro não modulado (Plant Efficiency Analyser – PEA, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, England).

Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Foram realizados três ensaios. O primeiro teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre os teores dos pigmentos cloroplastídicos. Nesse caso, o experimento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Como as determinações foram feitas em duas épocas (aos 30 e 45 dias de exposição aos tratamentos de luz), o efeito das mesmas foi avaliado por um teste de t para dados pareados a 5% de probabilidade. Dentro de uma mesma época, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O segundo ensaio teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidases e catalase. O delineamento experimental e os testes estatísticos foram semelhantes ao do primeiro ensaio.

Finalmente, o terceiro ensaio teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre a fluorescência da clorofila. O delineamento experimental e os testes estatísticos foram semelhantes ao do primeiro ensaio, todavia foram utilizadas dez repetições por tratamento.

Os tratamentos corresponderam a $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (uma lâmpada acesa), $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (três lâmpadas acesas), e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cinco lâmpadas acesas) sob

fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em prateleiras diferentes e totalmente rodeadas de isopor de maneira similar a descrita por Iarema (2004).

Inicialmente, todos os dados originais foram submetidos à análise de variância, obedecendo aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Levene).

Todas as análises foram efetuadas com o emprego do programa SAS versão 6 (SAS Institute, Inc., 1990).

Resultados e Discussão

Teste do Efeito da Zeatina sobre os Explantes

Durante o processo da escolha da melhor composição do meio de cultivo para fazer crescer apropriadamente os epicótilos de Urucum, foi realizado um experimento preliminar para testar o efeito da Zeatina.

Nesse ensaio ficou caracterizado que o meio desprovido de Zeatina não favoreceu o desenvolvimento dos epicótilos (Figura 1) sendo, portanto, um hormônio cuja presença se fez necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Por outro lado, nota-se que no meio de cultivo provido de Zeatina verificou-se uma redução significativa dos teores dos pigmentos cloroplásticos dos explantes, quaisquer que fossem as densidades de fluxo de luz empregadas (Figura 2). Não há uma razão que explique este fenômeno, reportada na literatura. Entretanto, pode-se especular que em meio contendo Zeatina não houve estímulo à rizogênese, o que pode ter comprometido a translocação de nutrientes e sua partição; além disso, houve proliferação de calo na extremidade proximal dos explantes, o que certamente pode haver incrementando esses problemas, talvez sendo estas algumas prováveis razões da redução nos teores dos pigmentos expressos por massa fresca.

O meio de cultivo sem reguladores de crescimento foi originalmente utilizado por Paiva Neto et al. (2003a), como meio de alongamento de gemas obtidas a partir de hipocótilos de Urucum, porém, tais gemas foram originadas em meio contendo Zeatina. No entanto, D'Souza e Sharon (2001) obtiveram o alongamento das gemas no mesmo meio em que aconteceu a indução de brotações múltiplas a partir tanto de ápices como de segmentos nodais sendo o meio mais efetivo aquele contendo 4,9 μM de 2-isopentenil adenina (2iP) contudo nesse trabalho não foi avaliado o efeito da Zeatina. Esses trabalhos corroboram o fato de que o efeito das citocininas sobre a morfogênese depende também da origem do explante e do tipo de citocinina empregada, entre outros fatores.

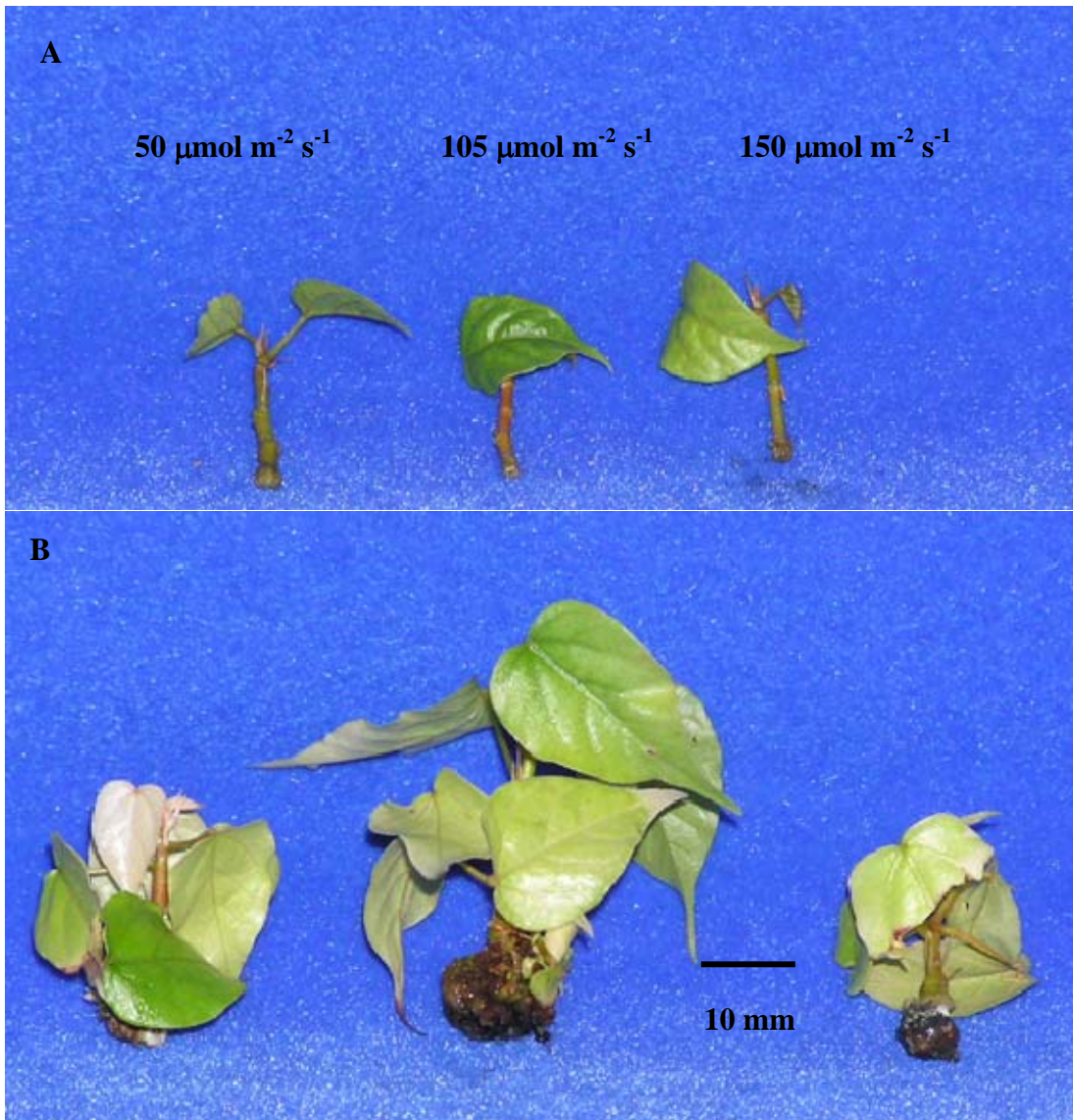


Figura 1 – Ápices caulinares de plântulas de *Bixa orellana* L. submetidos a três diferentes irradiancias (50, 105, e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cultivados em meio de cultivo na ausência (A) e na presença de Zeatina (B).

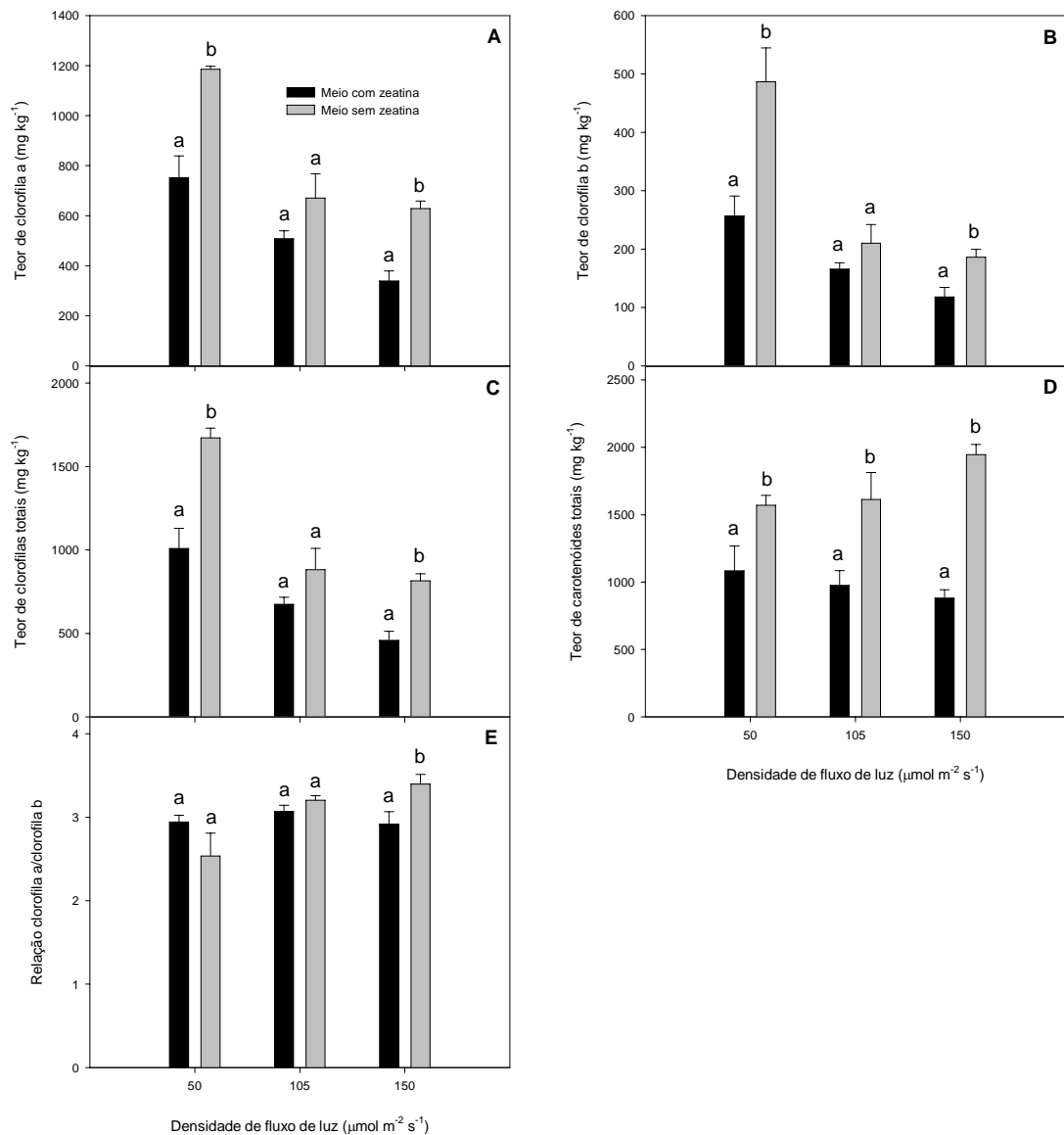


Figura 2 – Comparação do teor de pigmentos cloroplastídicos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato, cultivados em meio com e sem Zeatina e sob diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Sabe-se que as citocininas regulam uma série de processos do crescimento e desenvolvimento, sendo que estimula a proliferação de um grande espectro de tipos celulares, o que torna este hormônio mais efetivo que a giberelina e o ácido abscísico que também determinam a proliferação, porém, de algumas células e sob determinadas circunstâncias (Fosket, 1994). Além disto, a citocinina também participa na regulação de uma série de aspectos do desenvolvimento das plantas como, por exemplo, a iniciação do desenvolvimento dos cloroplastos, o retardamento da senescência foliar, o incremento na expansão dos cotilédones, a mobilização de nutrientes, a iniciação de brotos laterais além de regular junto com as auxinas a morfogênese *in vitro* (Fosket, 1994; Taiz e Zeiger, 1998).

O efeito do incremento da densidade de fluxo de luz sobre a redução dos teores de clorofilas *a*, *b* e totais pode ser verificado tanto no meio provido de Zeatina (Figura 3) quanto no meio em que esse regulador não foi suplementado (Figura 4). Nota-se que, em ambos os casos, não foi verificado qualquer incremento significativo nos teores de carotenóides totais. A maior disponibilidade de luz propicia uma condição para uma economia na síntese de clorofilas, ao passo que em baixas irradiâncias, a necessidade de otimizar o uso da radiação faz com que haja maior investimento na produção destes pigmentos (Boordman, 1997).

Os carotenóides estão associados à proteção do sistema fotossintético ao estresse foto-oxidativo (Pfündel e Bilger, 1994). Contudo, para as densidades de fluxo de luz empregadas não houve uma diferença estatística significativa nos teores deste pigmento. Nesse caso, as seguintes possibilidades podem existir: (a) as densidades de fluxo de luz empregadas não representam riscos de estresse foto-oxidativo, (b) se há alguma densidade de fluxo de luz que determine problema de foto-oxidação, os níveis de carotenóides atuais são suficientes para mitigar os mesmos, ou ainda, que existam outros mecanismos de proteção ao estresse foto-oxidativo operando com eficiência, (c) que se há alguma densidade de fluxo de luz que determine um estresse foto-oxidativo, os explantes podem apresentar problemas, a despeito dos mecanismos de defesa dos quais disponha, sobretudo considerando o fato de que os altos níveis de carotenóides encontrados neste estudo, nas folhas de Urucum, não foram exclusivamente de violaxantina, anteraxantina e zeaxantina, que são aqueles diretamente relacionados com a foto-proteção, mas sim de carotenóides totais.

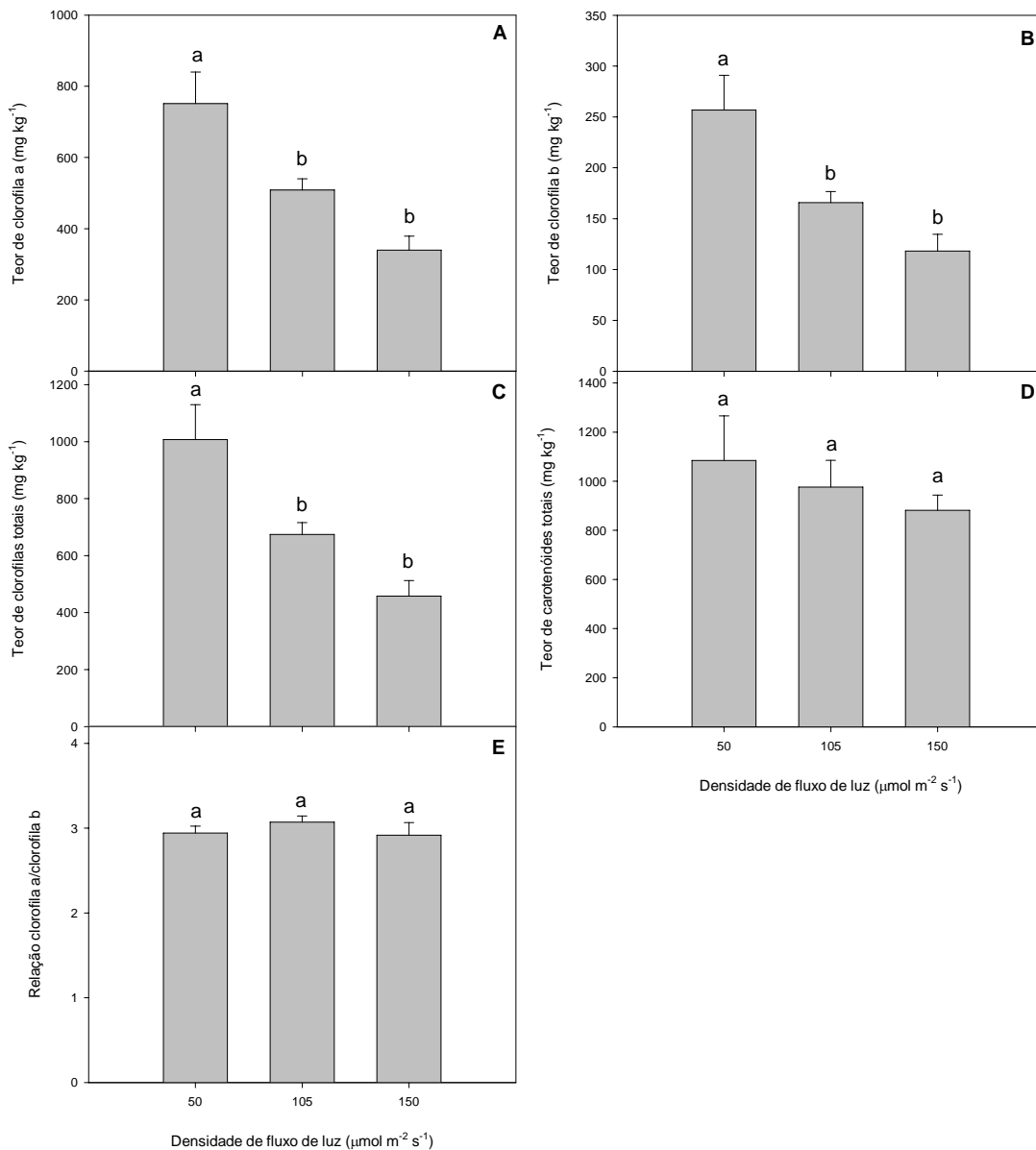


Figura 3 – Comparação do teor de pigmentos cloroplastídicos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato, cultivados em meio provido de Zeatina e sob diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

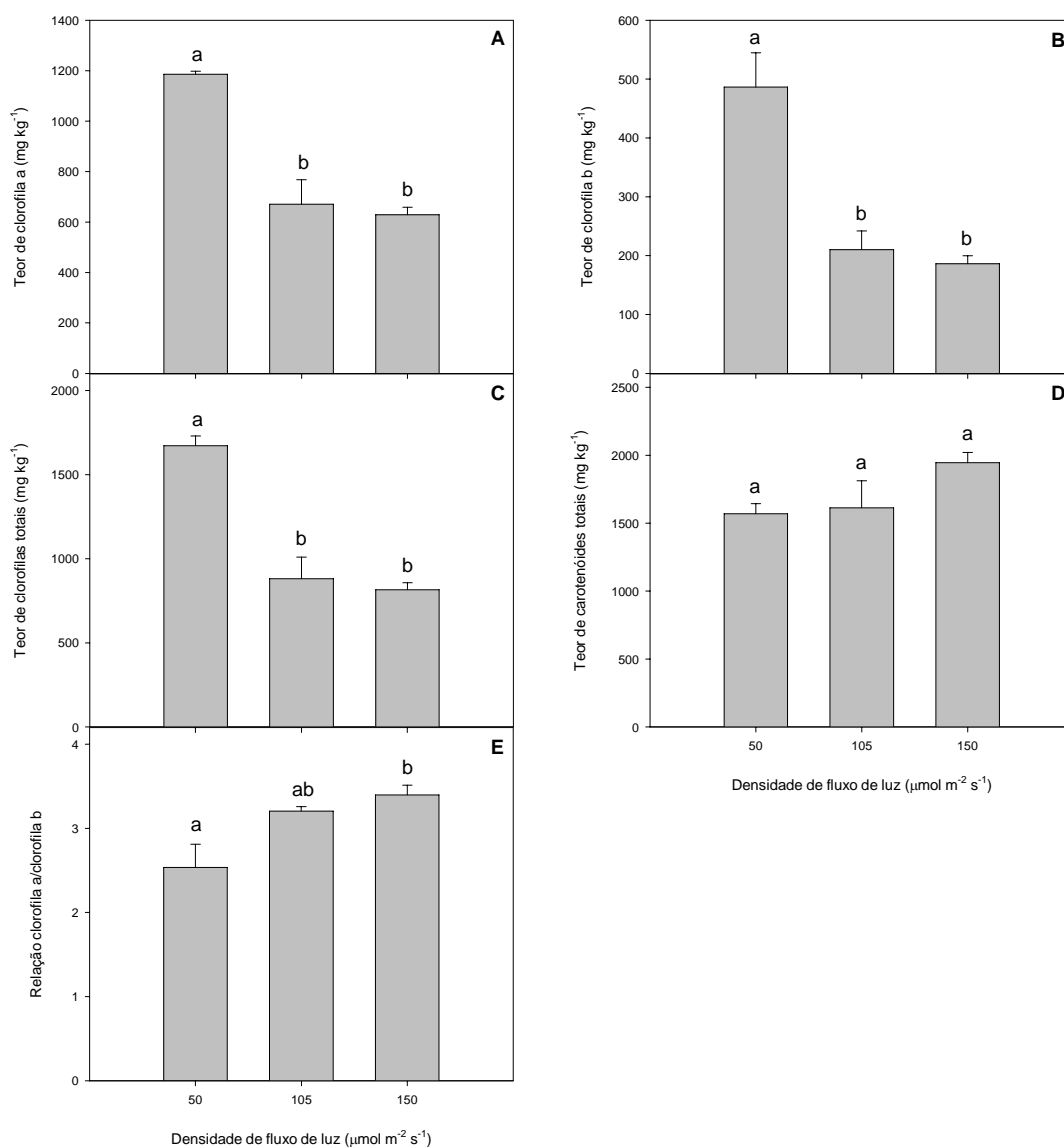


Figura 4 – Comparação do teor de pigmentos cloroplásticos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato, cultivados em meio desprovido de Zeatina e sob diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Efeito de Diferentes Densidades de Fluxo de Luz, sobre os Pigmentos Cloroplastídicos

A mesma tendência encontrada no ensaio preliminar para avaliar o uso da Zeatina no meio de cultivo foi verificada neste ensaio. Os teores de clorofilas *a*, *b* e totais reduziram com o incremento na densidade de fluxo de luz, sendo que não houve uma variabilidade temporal nessa tendência, quando feitas as avaliações aos 30 e 45 dias de exposição dos explantes aos tratamentos diferenciados de luz; ao passo que não se verificou qualquer variação estatisticamente significativa nos teores de carotenóides totais (Figuras 5 a 7).

Estudos com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* cultivada *in vitro* apontaram uma queda no teor dos pigmentos cloroplastídicos com o aumento da densidade de fluxo de luz (de 25 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provavelmente devida à degradação dos pigmentos foliares sendo mais evidente ao diminuir o suprimento de sacarose ao meio (Alexandre, 2002).

Já em *Lippia filifolia*, o efeito na redução das clorofilas e dos carotenóides só foi evidente ao comparar as densidades de fluxo de luz de 104 e 172 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No entanto, o teor dos carotenóides foi afetado também pelos diferentes meios de cultura utilizados. Embora houvesse alteração nos pigmentos fotossintéticos, o conteúdo de antocianinas não se alterou, fato que foi considerado por Iarema (2004) como demonstrativo de que essas densidades de fluxo de luz não ocasionaram estresse nas plantas.

Em *Persea americana* foi observada a redução no conteúdo de clorofila *a* e carotenóides e em *Liquidambar styraciflua* a diminuição do conteúdo de clorofila por área foliar com o aumento da irradiância (Viña et al., 2001; Lee et al., 1985).

Os teores de carotenóides encontrados nos explantes de Urucum foram semelhantes aos encontrados nas folhas das plantas adultas (Capítulo II), sendo muito elevados em comparação com espécies que reconhecidamente apresentam o ciclo das xantofilas como um mecanismo mitigador do estresse foto-oxidativo, como é o caso do Café, que apresenta teores ao redor dos 22,6 mg kg^{-1} (Oliveira et al., 2002).

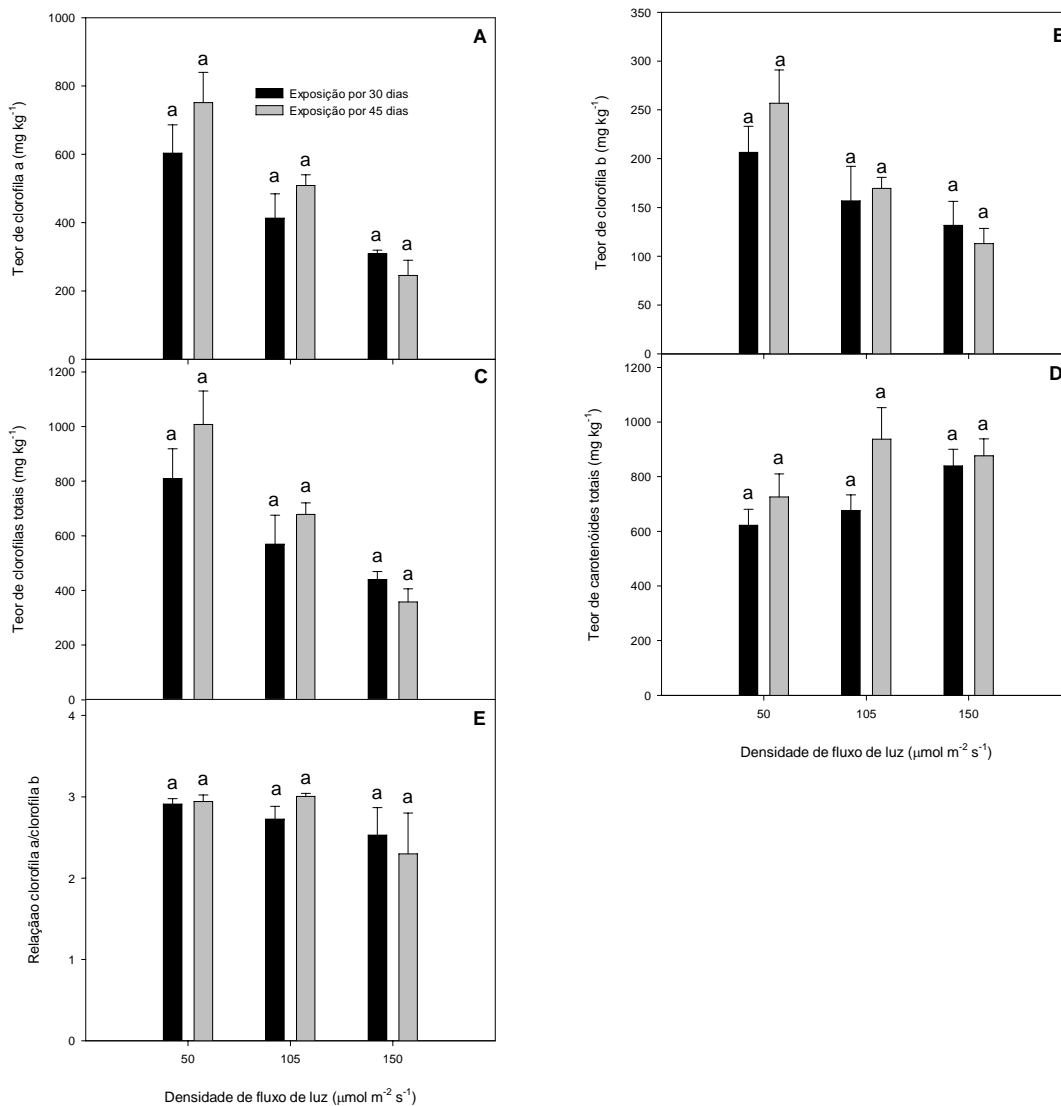


Figura 5 – Comparação do teor de pigmentos cloroplastídicos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 e 45 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

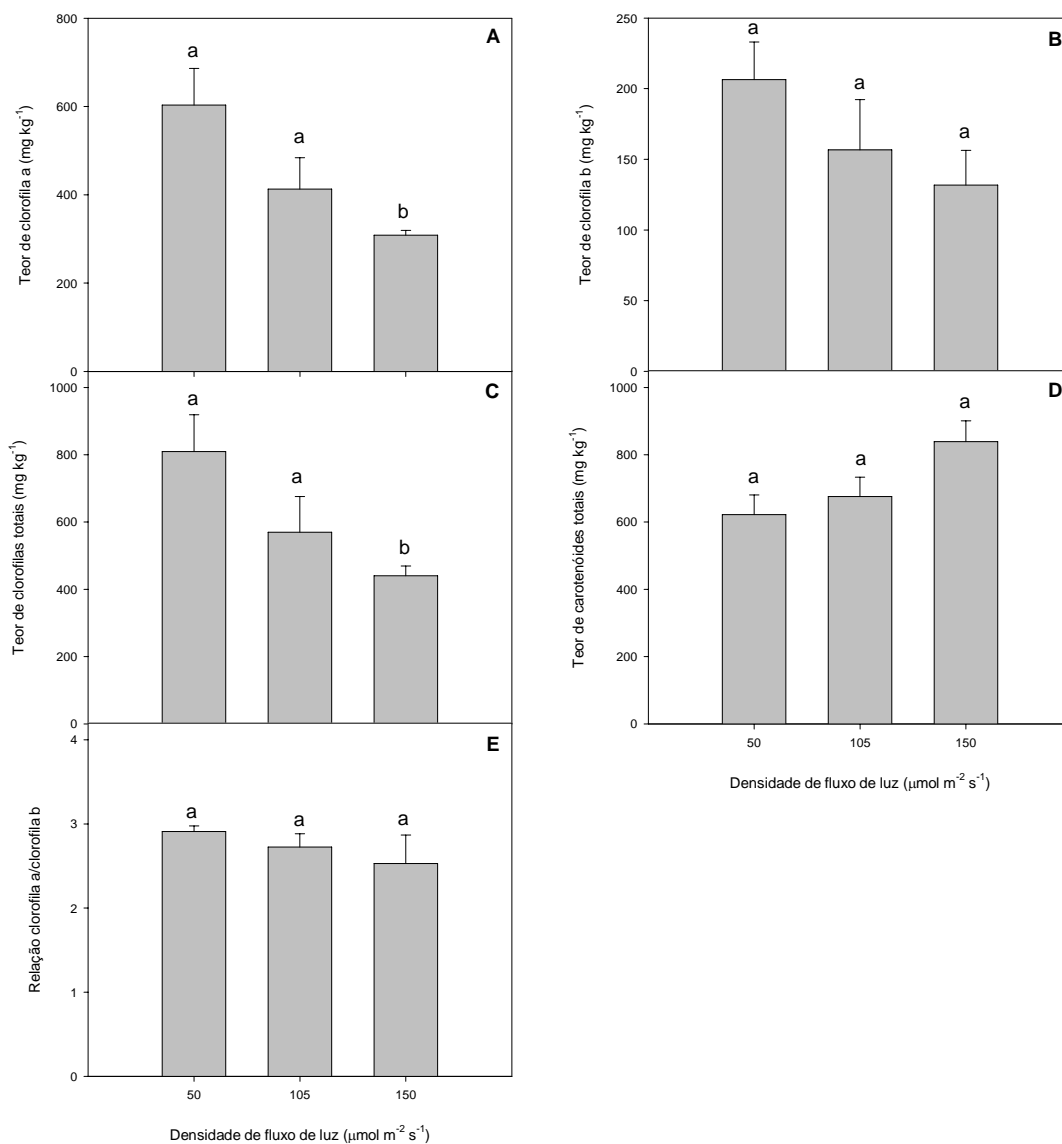


Figura 6 – Comparação do teor de pigmentos cloroplastídicos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

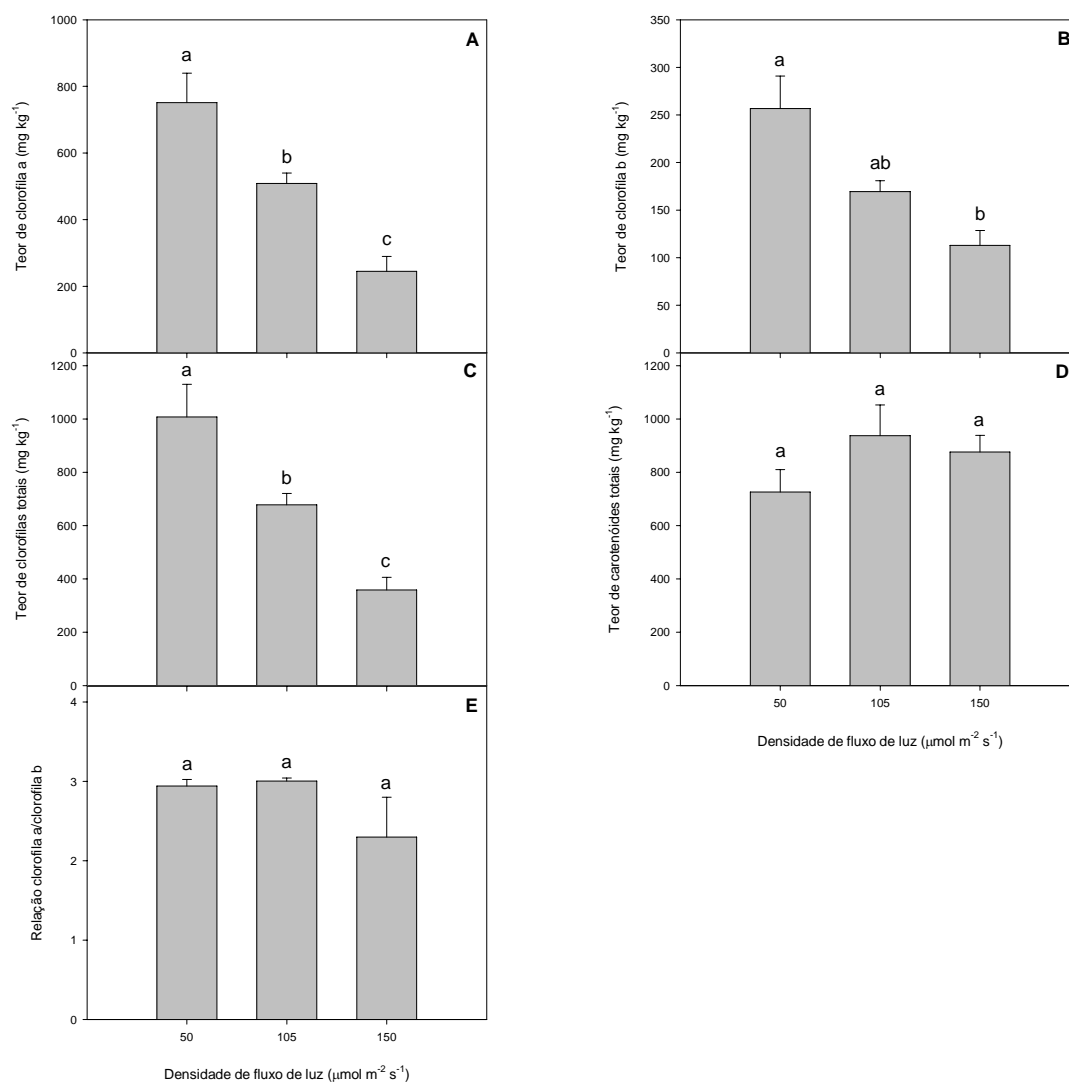


Figura 7 – Comparação do teor de pigmentos cloroplásticos entre explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 45 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenóides totais (D) e relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (E). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Para fins comparativos, também ficou evidenciado que os teores de carotenóides encontrados nas folhas dos epicótilos de Urucum foram superiores aos encontrados em outras espécies cultivadas *in vitro*, como por exemplo, o Maracujá, a Salsa-Parrilha, a Rosa, o Café e o Tabaco (dados não apresentados). No Capítulo III se ressalta a presença de idioblastos em folhas de Urucum, tanto de material coletado em campo quanto de material cultivado *in vitro*, contendo substâncias lipídicas provavelmente carotenóides. Por isso, o teor de carotenóides encontrado nas folhas dos epicótilos de Urucum reflete a presença de tais pigmentos e não exclusivamente os carotenóides contidos no cloroplasto. Estas considerações corroboram, portanto, com o fato de que o comportamento do material depende não só dos fatores ambientais como também de cada espécie em particular.

Atividade Enzimática de Explantes Submetidos a Diferentes Densidades de Fluxo de Luz

Das enzimas mitigadoras do estresse foto-oxidativo analisadas somente a peroxidase apresentou tendência mais clara de incremento em sua atividade, em decorrência do aumento na densidade de fluxo de luz, que pode ser observada aos 45 dias de exposição aos tratamentos diferenciados de luz; ao passo que as demais enzimas não apresentaram qualquer variação estatisticamente significativa em sua atividade (Figuras 8 a 10).

A foto-inibição, a foto-oxidação e a fotorrespiração são fenômenos que ocorrem com maior severidade quando há um excedente de energia proveniente dos fótons de radiação fotossinteticamente ativa em relação à sua demanda para o processo de assimilação do CO₂. Esta circunstância geralmente ocorre sob alta irradiância e se potencializa com outros fatores de estresse associados, como podem ser o déficit hídrico, o frio ou o calor excessivos, entre outros, e combinações entre estes fatores (Sofa et al., 2004). O excedente energético, nestes casos, é canalizado para processos que favorecem a produção de espécies ativadas de oxigênio, as quais são extremamente tóxicas para as células. Normalmente, o fotossistema II é o mais susceptível aos problemas resultantes da foto-oxidação, ao passo que o fotossistema I é mais estável (Melis, 1999).

Entretanto, estas condições de severidade ambiental são comuns em muitos ecossistemas naturais e as plantas que aí habitam apresentam mecanismos mitigadores desse efeito deletério. Na verdade, as espécies reativas de oxigênio podem ser eficientemente eliminadas por processos não enzimáticos, nos quais se fazem presentes os elementos α -tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, ascorbato e glutathione, e processos enzimáticos, nos quais se fazem presentes a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a guaiacol peroxidase (POD), enzimas que existem nos tecidos das plantas em múltiplas formas (Foyer et al., 1994).

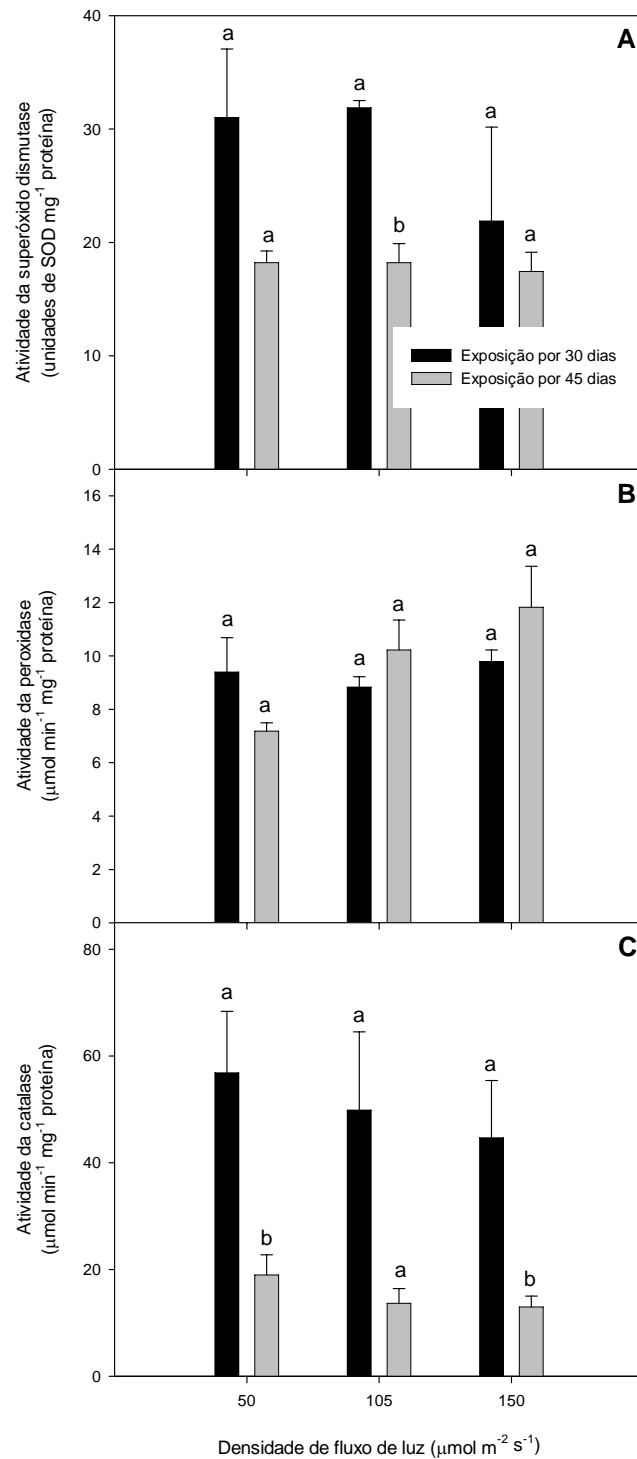


Figura 8 – Comparação da atividade enzimática em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 e 45 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: superóxido dismutase (A), peroxidase (B), catalase (C). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

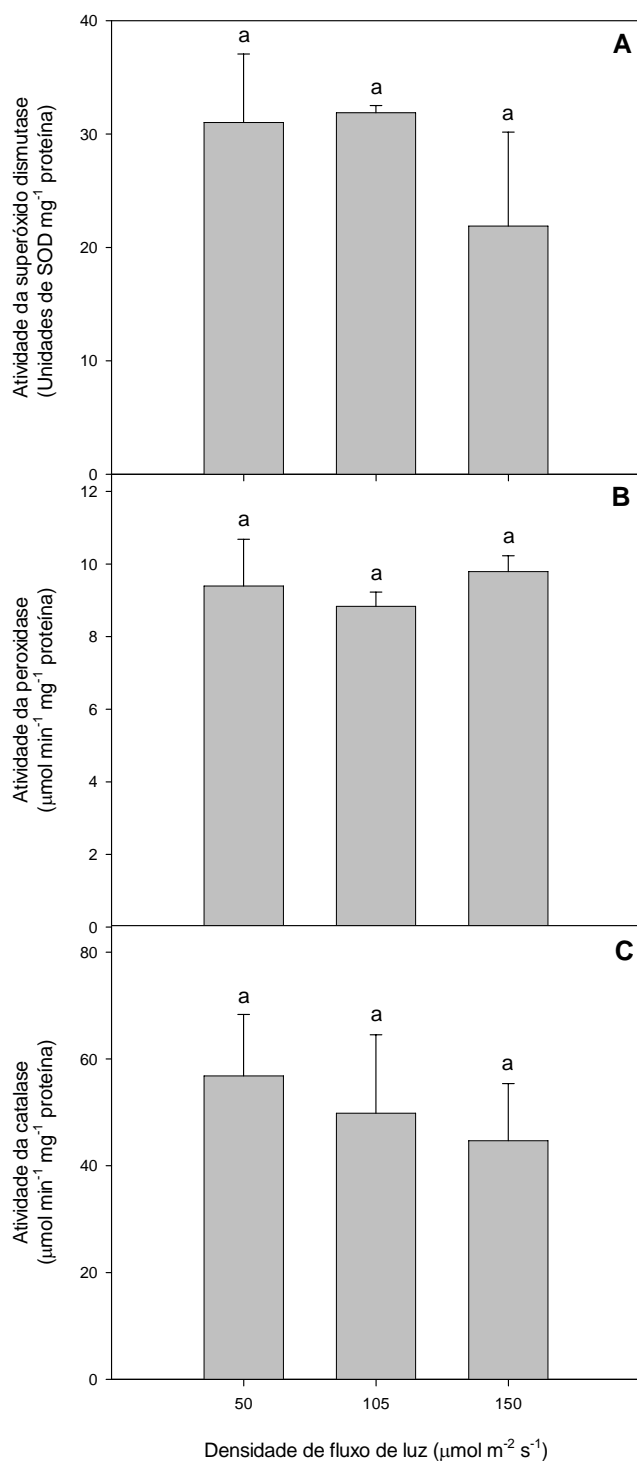


Figura 9 – Comparação da atividade enzimática em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: superóxido dismutase (A), peroxidase (B), catalase (C). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de t a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

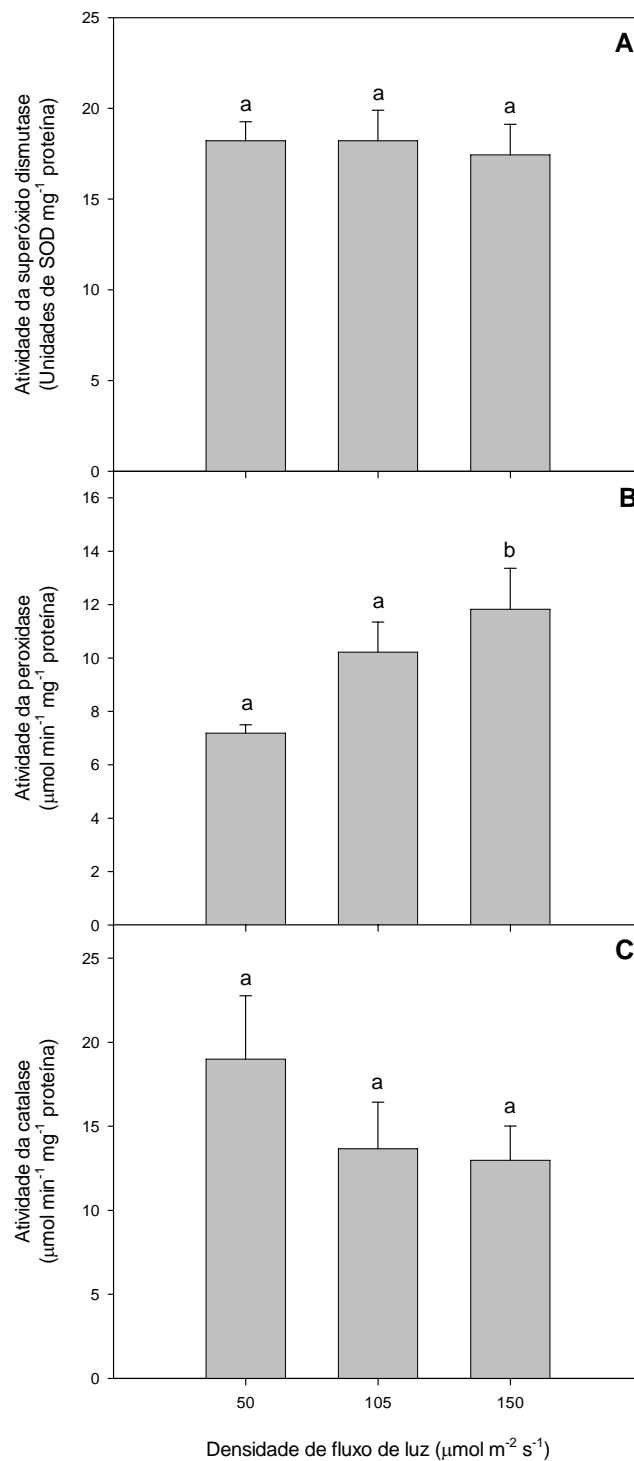


Figura 10 – Comparação da atividade enzimática em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 45 dias de exposição a diferentes densidades de fluxo de luz: superóxido dismutase (A), peroxidase (B), catalase (C). Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Portanto, a atividade das enzimas relacionadas com o estresse foto-oxidativo é variável e dependente da espécie. Em geral, quando estas enzimas são elementos chaves na mitigação do efeito do estresse, nota-se uma significativa expressão da atividade enzimática, em muitos casos atuando várias enzimas em conjunto. Entretanto, quando existem mecanismos não enzimáticos associados que concorrem para o mesmo fim, esse incremento na atividade das enzimas pode não ser diagnosticado de maneira significativa. Sofo et al. (2004) verificaram que a reidratação de Oliveiras, previamente submetidas ao déficit hídrico, promoveu redução na atividade da SOD, da APX e da CAT. Entretanto, somente a CAT apresentou uma diferença na dinâmica de redução da atividade quando comparadas plantas sob irradiância e plantas sombreadas, indicando que estas enzimas são efetivamente mecanismos que contribuem para amenizar os problemas oriundos da foto-oxidação nesta espécie. Em Milho existem diagnosticadas três catalases, a CAT-1, a CAT-2 e a CAT-3, sendo que a luz ultra-violeta promove uma expressão diferenciada destas enzimas, em que a CAT-2 é continuamente expressa e a baixos níveis, a CAT-3 é continuamente expressa a um nível 10 vezes superior ao da CAT-2, para as condições de plantas cultivadas continuamente no escuro ou na luz, ou apresenta um comportamento circadiano para plantas cultivadas sob fotoperíodo de 12 h / 12 h (claro/escuro) e, finalmente, a expressão da CAT-1 é independente da radiação; sendo estas enzimas relacionadas com a proteção desta planta ao efeito do estresse foto-oxidativo (Boldt e Scandalios, 1997). Por outro lado, Candan e Tarhan (2003), afirmam que o incremento na atividade das enzimas SOD e CAT em plantas de Menta não é suficiente como mecanismo de redução dos problemas causados pelas espécies ativas de oxigênio em plantas deficientes em Mg^{2+} , que sofrem injúrias significativas decorrente da peroxidação de lipídios das membranas cloroplastídicas nessas circunstâncias. Finalmente, há casos em que o efeito protetor de mecanismos não enzimáticos, como é o caso dos carotenóides, parece ser suficiente para reduzir significativamente o efeito do estresse foto-oxidativo (Demming-Adams, 1990).

Aparentemente, o sistema de transporte de elétrons da etapa fotoquímica da fotossíntese é a maior fonte de espécies reativas de oxigênio dos tecidos vegetais (Asada, 1994).

Estas espécies reativas de oxigênio são formas parcialmente reduzidas do O_2 atmosférico. Resultam da excitação do O_2 para formar o oxigênio singlete (O_2^1), ou da transferência de um, dois ou três elétrons ao O_2 para formar, respectivamente, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($\cdot OH$). Ao

contrário do oxigênio atmosférico no seu estado natural tripleto (O_2^3), as espécies reativas de oxigênio são capazes de uma irrestrita oxidação de vários dos componentes celulares e podem levar à destruição oxidativa da célula (Mittler, 2002).

O O_2^- se forma a partir da redução do O_2 , que evolui a partir da reação de quebra da molécula de água no fotossistema II; e que no fotossistema I compete com a ferredoxina como acceptor de elétrons. Já o H_2O_2 se forma pela ação da superóxido dismutase sobre o O_2^- . Finalmente, o $\cdot OH$ é gerado a partir da interação de H_2O_2 com formas reduzidas de íons metálicos como o Fe(II) e Cu(I), que adquirem esse estado pela redução de Fe(III) e Cu(II) pelo O_2^- . Dado a que não há uma enzima específica que atue sobre o OH, as plantas necessitam de um mecanismo eficiente para a eliminação de O_2^- e H_2O_2 (Asada, 1999).

Nesse sentido, a superóxido dismutase tem seu papel na transformação do O_2^- em H_2O_2 e a peroxidase e a catalase na transformação de H_2O_2 em H_2O . A superóxido dismutase e a peroxidase ocorrem nos cloroplastos, enquanto que a catalase está restrita aos peroxissomas. Entretanto, sabe-se que a catalase é indispensável como mitigadora do estresse causado pelas espécies reativas de oxigênio, sobretudo porque nesses casos o H_2O_2 se difunde para o peroxissoma. Em geral, sob condições de estresse foto-oxidativo, estas enzimas tem incrementado sua atividade, contudo as diferenças inter e intra-específicas caracterizam as particularidades do modo de prevenção de danos dos diferentes materiais vegetais (Mittler, 2002).

Avaliação do Estresse Foto-Oxidativo

A análise da relação F_v/F_m permitiu identificar um processo de foto-inibição causado pela maior densidade de fluxo de luz empregada, sendo este um fenômeno que se acentuou com o tempo de exposição dos explantes ao referido tratamento (Figuras 11, 12 e 13).

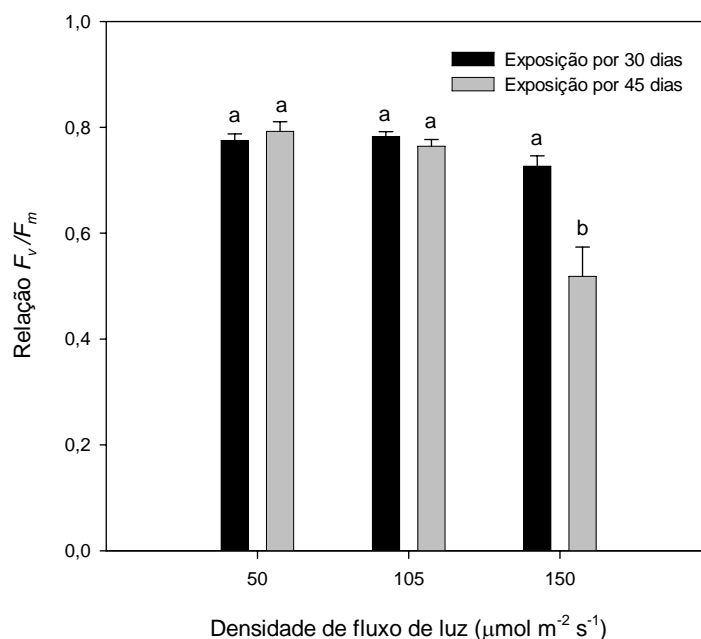


Figura 11 – Avaliação do efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre a relação F_v/F_m em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 e aos 45 dias de exposição. Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de t a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Em contrapartida, as densidades de fluxo de 50 e 105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não causaram qualquer problema de foto-inibição durante o tempo de exposição de 30 e 45 dias (Figuras 11, 12 e 13).

A relação F_v/F_m representa o “quenching” fotoquímico da fotossíntese. Refere-se ao quanto da energia interceptada pela folha e utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese pode ser destinada a uma correspondente assimilação do CO_2 .

Sob condições de restrição na assimilação do CO_2 , há um incremento do “quenching” não fotoquímico, como a dissipação energética por calor ou pela emissão de fluorescência da clorofila, fazendo com que a relação F_v/F_m seja reduzida nessas circunstâncias (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993; Critchley, 1998). Este mesmo fenômeno ocorre se há um desequilíbrio estequiométrico entre os processos fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese. Quando a interceptação da radiação excede a capacidade de uso dessa energia, ainda que não exista qualquer impedimento à

assimilação do CO_2 , igualmente ocorre um incremento do “quenching” não fotoquímico. Sob baixa densidade de fluxo de luz, quando o rendimento quântico máximo pode ser verificado, cerca de 97% dos fótons absorvidos são utilizados para o processo fotoquímico, 2,5% são transformados em calor e 0,5% são re-emitidos como fluorescência. Por outro lado, se todo centro de reação do fotossistema II está fechado, com o acúmulo dos componentes da cadeia de transporte de elétrons oxidados, 95-97% da energia absorvida é dissipada na forma de calor e 2,5-5,0% na forma de fluorescência (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993).

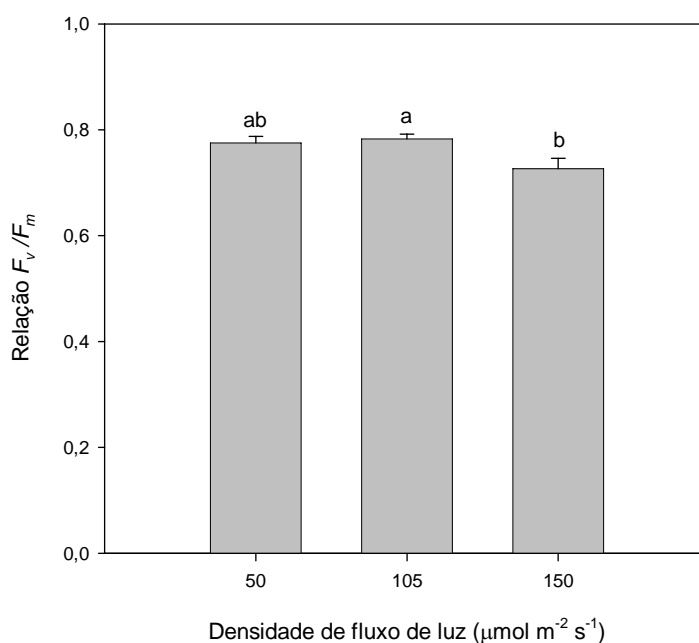


Figura 12 – Avaliação do efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre a relação F_v/F_m em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 30 dias de exposição. Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Nota-se que já aos 30 dias de exposição, os explantes sob $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ já apresentavam uma tendência de foto-inibição, com um valor da relação F_v/F_m igual a 0,726 (Figura 12). Em geral, considera-se como valores típicos da relação F_v/F_m para

folhas de sol em torno de 0,8 ou ligeiramente inferior e para folhas de sombra ou iluminadas, valores da ordem de 0,83 e 0,85, ao passo que se considera que valores inferiores a 0,725 certamente indicam um problema de foto-inibição (Critchley, 1998). Para um grande número de plantas vasculares, valores médios da relação F_v/F_m iguais a $0,832 \pm ,0004$ são característicos de plantas saudáveis sem problemas com a foto-inibição (Björkman e Demming, 1987).

Aos 45 dias de exposição à elevada densidade de fluxo de luz, os explantes apresentaram um valor da relação F_v/F_m igual a 0,518, indicando claramente um problema de foto-inibição (Figura 13).

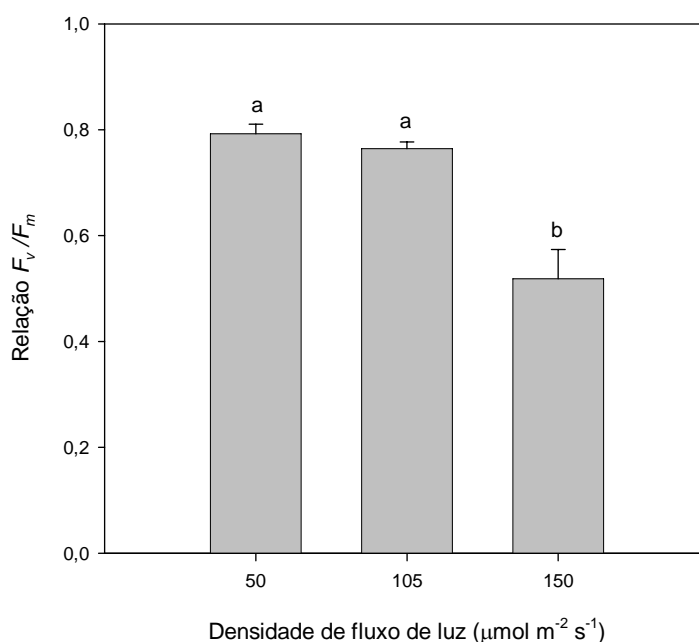


Figura 13 – Avaliação do efeito de diferentes densidades de fluxo de luz sobre a relação F_v/F_m em explantes de Urucum do tipo Bico de Pato aos 45 dias de exposição. Nota: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Quando analisados em conjunto os resultados obtidos do teor dos pigmentos cloroplastídicos, da atividade das enzimas do estresse foto-oxidativo e da fluorescência da clorofila, nota-se que a despeito dos elevados teores de carotenóides totais presentes nas folhas dos explantes, estes não são suficientes para mitigar o efeito do estresse foto-oxidativo causado pela alta densidade de fluxo de luz.

Pelo teor de carotenóides totais não há como se predizer quanto desse valor estará efetivamente relacionado com a foto-proteção (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina) e, considerando que mesmo nas folhas há presença de bixina (Capítulo III), que entra na contabilidade do teor de carotenóides totais, então é provável que o mecanismo de foto-proteção via ciclo das xantofilas não seja eficiente para minimizar os efeitos da foto-inibição nos explantes de Urucum.

Por outro lado, nota-se que das enzimas diretamente responsáveis pela mitigação das espécies reativas de oxigênio no cloroplasto somente a peroxidase apresentou uma tendência de incremento na atividade com o aumento da densidade de fluxo de luz aos 45 dias de exposição.

Do exposto, conclui-se que os explantes não apresentam mecanismos eficazes de mitigação do efeito foto-oxidativo, tendo a densidade de fluxo de $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como limite para cultivos de se estendam até 45 dias.

Conclusões

A Zeatina mostrou-se necessária para o desenvolvimento dos explantes de Urucum, entretanto, esse hormônio contribuiu para a redução nos teores de pigmentos cloroplastídicos. Isto suscita novos temas para pesquisa: a busca de um possível substituto que possibilite o desenvolvimento normal dos explantes sem efeitos colaterais e a identificação da razão pela qual o hormônio causa a redução nos teores dos pigmentos.

Nos explantes crescidos em meio provido de Zeatina, verificou-se que os teores de clorofilas *a* e *b* diminuíram em 95,4% e 56,8% com o incremento na densidade de fluxo de luz de 50 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente; sem alteração nos teores de carotenóides totais, cuja média geral para estes casos foi de 766 mg kg^{-1} , independentemente do tempo de exposição a que os explantes estiveram sujeitos.

Independentemente da densidade de fluxo de luz, a atividade da superóxido dismutase e da catalase sofreu uma redução com o tempo de exposição, da ordem de 57,4% e 231,7%; respectivamente. Contudo, nestas mesmas condições a atividade das peroxidases sofreu um incremento de 4,1% e, aos 45 dias de exposição, foi identificado um incremento na atividade enzimática daqueles explantes sob maior densidade de fluxo de luz, passando de 7,2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, quando a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 11,8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, quando a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A densidade de fluxo de luz de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causou foto-inibição nos explantes, não sendo recomendada para cultivos *in vitro* da espécie. Nessas condições, a relação F_v/F_m foi igual a 0,726 e 0,581 aos 30 e 45 dias de exposição, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- Alexandre, R. S. 2002.** *Germinação in vitro e organogênese em explantes do maracujazeiro (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado em Fitotecnia. 94 p.
- Anderson, M.D.; Prasad, T.K.; Stewart, C.R. 1995.** Changes in isozyme profile of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, **109**:1247-1257.
- Asada, K. 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. **In:** *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants* (C.H. Foyer e P.M. Mullineux, eds.). CRC Press, Boca Ratón. pp. 77-104.
- Asada, K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**:601-639.
- Bartley, G.E.; Scolnik, P.A. 1995.** Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction; and human health. *The Plant Cell*, **7**:1027-1038.
- Beauchamp, C. O.; Fridovich, I. 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**:276-287.
- Björkman, O.; Demming, B. 1987.** Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170**:489-504.
- Boldt, R.; Scandalios, J.G. 1997.** Influence of UV-light on the expression of the *Cat2* and *Cat3* catalase genes in maize. *Free Radical Biology & Medicine*, **23**:505-514.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R. ; Öquist, G.1993.** Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. **In:** *Photosynthesis and Production in a Changing Environment* (D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood, S.P. Long, eds.). Chapman & Hall, London. pp. 193-206.
- Boordman, N.K. 1997.** Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **28**:355-377.
- Bouvier, F.; Dogbo, O.; Câmara, B. 2003.** Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, **300**:2089-2091.
- Candan, N.; Tarhan, L. 2003.** Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**:35-40.

- Chance, B.; Maehley, A.C. 1955.** Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, **2**:764-775.
- Critchley, C. 1998.** Photoinhibition. **In:** *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (A.S. Ragavendra, ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 264-272.
- Cuartas C., S. 2003.** *Estudio preliminar para la obtención in vitro de células de Bixa orellana L. (Achiote)*. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, Colombia. Tesis de Maestría en Microbiología. 106 p.
- De Oliveira, A.C.A.X.; Silva, I.B.; Manhaes-Rocha, D.A. 2003.** Introduction to liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **36**:113-118.
- Del Longo, O.T.; González, C.A.; Pastori, G.M.; Trippi, V.S. 1993.** Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology*, **34**:1023-1028.
- Demming-Adams, B. 1990.** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1020**:1-24.
- D'Souza, M.C.; Sharon, M. 2001.** In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **37**:168-172
- Fosket, D.E. 1994.** Light, hormones, and cell signaling pathways. **In:** *Plant Growth and Development. A Molecular Approach* (D.E. Fosket). Academic Press, San Diego. pp. 271-340.
- Foyer, C.H.; Lelandais, M.; Kunert, K.J. 1994.** Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **92**:696-717.
- Gamborg, O. L; Miller, R. A.; Ojima, K. 1968.** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, **50**:151-158.
- Grassmann, J.; Hippeli, S.; Elstner, E.F. 2002.** Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**:471-478.
- Havir, E.A. ; McHale, N.A. 1987.** Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84**:450-455.
- Iarema, L. 2004.** *Lippia filifolia* Mart. (*Verbenaceae*) cultivada *in vitro*: anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado. 85 p.
- Jako, C.; Coutu, C.; Roewer, I.; Reed, D.W.; Pelcher, L.E.; Covello, P.S. 2002.** Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, **163**:141-145.

- Kar, M.; Mishra, D. 1976.** Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, **57**:315-319.
- Kozai, T. 1991.** Micropropagation under photoautotrophic conditions. **In:** *Micropropagation: Technology and application* (P.G. Debergh; R.H. Zimmermann, Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 447-469.
- Lee, N.; Wetzstein, Y; Sommer, H.E. 1985.** Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-culture plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, **78**:637-641.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, **148**:350-382.
- Melis, A. 1999.** Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*, **4**:130-135.
- Mercadante, A.Z. ; Pfander, H. 1998.** Carotenoids from Annatto: A review. *Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry*, **2**:79-91.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, **7**:405-410.
- Murashige, T. ; Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-497.
- Narváez, J.A.; Flores-Perez, P.; Herrera-Valencia, V.; Castillo, F.; Ku-Cauich, R.; Canto-Canche, B.B.; Santana-Buzzy, N.; Rivera-Madrid, R. 2001.** Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in *Bixa orellana* L. *HortScience*, **36**:982-986.
- Oliveira, J.G. de; Alves, P.L.C.A.; Magalhães, A.C. 2002.** The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **14**:95-104.
- Paiva Neto, V.B.; Mota, T.R.; Otoni, W.C. 2003a.** Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **80**:32-38.
- Paiva Neto, V.B.; Botelho, M.N.; Aguiar, R.; Silva, E.A.M.; Otoni, W.C. 2003b.** Somatic embryogenesis from immature embryos of Annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **39**:629-634.
- Pfündel, E.; Bilger, W. 1994.** Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research*, **42**:89-109.
- SAS Institute Inc. 1990.** *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed., v. 2, SAS Institute, Cary. 796 p.

- Seon, J.-H.; Cui, Y.-Y.; Kozai, T. ; Paek, K.-Y. 2000.** Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **61**:135-142.
- Silva, C.R. da; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M. de L.P. 2001.** Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*, **43**:561-566.
- Smallwood, M.F; Calvert C.M.; Bowles, D.J. 1999.** *Plant Response to Environmental Stress*. BIOS Scientific Publisher, Oxford. 224 p.
- Sofa, A.; Dichio, B. Xiloyannis, C.; Masia, A. 2004.** Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, **166**:293-302.
- Taiz L., Zeiger, E. 1998.** Cytokinins. **In:** *Plant Physiology* (L. Taiz ; E. Zeiger). Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland. pp. 621-650.
- Viña, G. dela; Barceló-Munõz, A.; Pliego-Alfaro, F. 2001.** Effects of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, **65**:229-237.
- Zaldívar-Cruz, J.M.; Ballina-Gómez, H.; Guerra-Rodríguez, C.; Avilés-Berzunza, E.; Godoy-Hernández, G.C. 2003.** *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the *gus* reporter gene. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, **73**:281-284.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que:

- Do ponto de vista da capacidade fotossintética, ambos os grupos de plantas de Urucum analisados – plantas com frutos verde pilosos e plantas com frutos avermelhado pilosos – não apresentam diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros das curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz e à concentração intercelular de CO₂. Para esta última, somente o coeficiente associado à concavidade da curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração intercelular de CO₂ diferiu significativamente entre as plantas dos dois grupos analisados.

- Os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima encontrados foram iguais a 16,94 e 21,40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de luz iguais a 22,0 e 23,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e do ponto de saturação de luz iguais a 1017,9 e 1530,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para os grupos de planta com fruto verde piloso e avermelhado piloso, respectivamente. Os valores médios da estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima encontrados foram iguais a 16,11 e 14,64 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, do ponto de compensação de CO₂ iguais a 63,2 e 62,7 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e da eficiência carboxilativa da Rubisco iguais a 0,1312 e 0,1494 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para os grupos de planta com frutos verde pilosos e avermelhado pilosos, respectivamente.

- Foi verificada correlação linear negativa entre a eficiência quântica máxima e a irradiância de saturação ($r = -0,7794$; $P = 0,0176$) e outra positiva entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética bruta máxima e a irradiância de saturação ($r = 0,8780$; $P = 0,0018$). Ficaram evidenciadas correlações lineares negativas entre a estimativa assintótica da taxa fotossintética líquida máxima e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,6842$; $P = 0,0408$), entre a eficiência carboxilativa e o ponto de compensação de CO₂ ($r = -0,8208$; $P = 0,0067$) e entre a limitação estomática à fotossíntese e a concentração intercelular de CO₂ para uma concentração ambiental de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ($r = -0,8927$; $P = 0,0012$).

- Os teores dos pigmentos cloroplastídicos não foram estatisticamente diferentes para ambos os grupos analisados. Foram verificados valores médios de 1629,6 mg kg^{-1} de clorofila *a*, 643,4 mg kg^{-1} de clorofila *b* e 2272,9 mg kg^{-1} de carotenóides totais. Os

teores de bixina nas sementes das plantas de ambos grupos também não foram estatisticamente diferentes, com um valor médio de 4,42% que as classificam como boas produtoras do corante. Os elevados teores de carotenóides nas folhas, em comparação com os de outras espécies, suscitou a possível existência de mecanismos de transporte de carotenos ou então a síntese de bixina ou outros carotenos nas folhas dessa espécie.

- As folhas de Urucum apresentaram como característica anatômica particular marcante presença de idioblastos ramificados contendo substâncias lipofílicas, tais como a bixina, como foi evidenciado por meio da reação com Sudan IV. Adicionalmente, a cromatografia em camada fina permitiu confirmar a presença de bixina nas folhas a qual esteve presente em todos os extratos analisados.

- Sob condições *in vitro*, a inclusão de Zeatina ao meio mostrou-se necessária para o desenvolvimento de ápices caulinares de Urucum do tipo cultivado Bico de Pato; entretanto, esse hormônio contribuiu para a redução nos teores de pigmentos cloroplastídicos. Nos explantes crescidos em meio provido de Zeatina, verificou-se que os teores de clorofilas *a* e *b* diminuíram em 95,4% e 56,8% com o incremento na densidade de fluxo de luz de 50 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, sem alteração nos teores de carotenóides totais, cuja média geral para estes casos foi de 766 mg kg^{-1} .

- Independentemente da densidade de fluxo de luz, a atividade da superóxido dismutase e da catalase sofreu redução com o tempo de exposição, da ordem de 57,4% e 231,7%; respectivamente. Contudo, nestas mesmas condições a atividade das peroxidases sofreu um incremento de 4,1% e, aos 45 dias de exposição, foi identificado um incremento na atividade enzimática daqueles explantes sob maior densidade de fluxo de luz. A densidade de fluxo de luz de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causou foto-inibição nos explantes, não sendo recomendada para cultivos *in vitro* da espécie. Nessas condições, a relação F_v/F_m foi igual a 0,726 e 0,581 aos 30 e 45 dias de exposição, respectivamente.