

CLÉBIO PEREIRA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES E DE ESTRUTURAS
SECRETORAS DE BIXINA EM URUCUM (*Bixa orellana* L.):
ASPECTOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

F383d
2012

Ferreira, Clébio Pereira, 1981-

Desenvolvimento de sementes e de estruturas secretoras de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.): aspectos anatômicos e químicos / Clébio Pereira Ferreira. – Viçosa, MG, 2012. vii, 48f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Urucum - Sementes. 2. Urucum - Histoquímica.
3. *Bixa orellana*. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-
Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.68

CLÉBIO PEREIRA FERREIRA

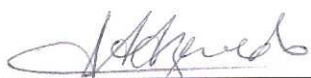
**DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES E DE ESTRUTURAS
SECRETORAS DE BIXINA EM URUCUM (*Bixa orellana* L.):
ASPECTOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS**

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

APROVADA: 17 de dezembro de 2012.


Prof^a Denise Maria. T. de Oliveira


Prof. João Paulo Viana Leite


Prof^a Aristéa Alves Azevedo


Prof. Eduardo E. de Lima e Borges


Prof^a Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

Dedicatória

À minha família pelo amor, carinho e dedicação.

*Aos meus mestres e amigos pelos ensinamentos e
formação profissional, pessoal e ética.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela inigualável oportunidade de realização de um sonho e concretização de um objetivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica e a todos os docentes pelos ensinamentos e por toda experiência profissional repassada ao longo do curso.

À Professora Marília Contin Ventrella, pelo apoio, incentivo e principalmente por aceitar o desafio de orientar um projeto a mais de mil e quinhentos quilômetros de distância.

Aos membros da banca Prof^a. Aristéa Alves Azevedo (UFV), Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira (UFMG), Prof. João Paulo Viana Leite (UFV) e Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges (UFV).

Aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial as professoras Aristéa Alves Azevedo, Luzimar Campos da Silva, Marília Contin Ventrella e Renata Maria Strozi Alves Meira, pela estrutura disponível, por todo apoio, ensinamentos e principalmente pela vivência em sala de aula e no laboratório.

Ao Ângelo, amigo e funcionário do Departamento de Biologia Vegetal pelo profissionalismo e dedicação ao curso.

Ao Hugo Rody Vianna Silva, pela imensurável colaboração nas análises do teor de bixina.

Ao professor e aos técnicos do Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, e às estudantes de iniciação científica Thaline Martins Pimenta e a Andréa Lanna Almeida pelo auxílio na quantificação do material de reserva.

Aos técnicos do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Ao professor Paulo César Stringheta, pelo incentivo e inúmeras sugestões durante o decorrer do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Advânio, Ana Claudia, Day, Diego, Dya, Ítalo, Karina, Lorena, Mateus, Naiara, Narah, Nívea, Pedrão, Rafaela, Sarinha, Sarão, Thiaguinho, Tica e Vinicius, pelos momentos de descontração e pela troca diária de conhecimentos.

Ao meu amigo Vitor Peçanha de Miranda Coelho, pelo abrigo e receptividade quando cheguei a Viçosa, pelas dicas e discussões anatômicas, pelos momentos de

descontração e de saudosismo de nosso Nordeste e principalmente pela amizade a mim dedicada.

À minha querida Andrea Lanna Almeida, pela amizade, boa vontade e por sua grande contribuição no processamento do material em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura.

Aos grandes amigos que encontrei em Viçosa e que irei levar pra sempre em pensamentos e no coração, Márcio Flequisson, Bruno Toríbio, Josi Bessa, Josi Rossini, Vanessa Terra, Vanessa Prass, Dona Cida, Flávia, Gláucia e Reinaldo.

Aos amigos nordestinos reencontrados em Viçosa, Madriano e Carol.

Aos meus eternos amigos do LAFF, Prof. Rejane Pimentel, Milena, João, Aurinete, Graça e principalmente a minha saudosa morena, Priscila Gomes Corrêa (*in memoriam*).

À minha imensa família, avó, tios, primos, sogra, cunhado e cunhadas, por me ensinarem o que é o amor. Em especial aos meus pais, Aderaldo e Creuzélia, e ao meu irmão, Cristiano, pelo carinho, confiança e dedicação em toda e qualquer circunstância.

À minha amada esposa, Maria Luiza Paes Santos, por todo amor, carinho, paciência, amizade e tudo mais dedicado a mim nesses dez anos em que estamos juntos.

À minha mais linda flor, Mariana Paes Pereira Ferreira, por me fazer sentir algo que nem em meus mais puros e sinceros sentimentos eu poderia imaginar que tinha... algo tão mágico e indescritível que me enche os olhos de lágrimas e o coração de amor e alegrias.

A Deus, por colocar cada um de vocês em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e acúmulo de reservas em sementes de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	8
Resumo	8
Introdução	9
Material e métodos	10
Material vegetal e coleta	10
Estereomicroscopia	10
Microscopia de luz	10
Análise bromatológica	11
Resultados	12
Estrutura do óvulo	12
Desenvolvimento dos tegumentos	12
Desenvolvimento do nucelo, do endosperma e do embrião	14
Acúmulo de reservas no endosperma e no embrião	15
Discussão	22
Conclusões	24
Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO 2. Desenvolvimento de estruturas secretoras de bixina em sementes de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.): anatomia, histoquímica e fitoquímica	30
Resumo	30
Introdução	31
Material e métodos	32
Material vegetal e coleta	32
Estereomicroscopia	32
Microscopia de luz	32
Microscopia eletrônica de varredura	33
Quantificação de bixinóides	36
Resultados	34
Discussão	41
Conclusões	43
Referências bibliográficas	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48

RESUMO

FERREIRA, Clébio Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2012. **Desenvolvimento de sementes e de estruturas secretoras de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.): aspectos anatômicos e químicos.** Orientadora: Marília Contin Ventrella.

As sementes do urucum (*Bixa orellana* L.), que apresentam dormência, e as estruturas secretoras de bixina do tegumento seminal, ainda são pouco compreendidas do ponto de vista anatômico, histoquímico e químico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento das sementes de urucum e a ontogenia das estruturas secretoras de bixina por meio de análises anatômicas, micromorfológicas, histoquímicas e químicas. Sementes de urucum foram coletadas da antese aos 180 dias após a antese (d.a.a.), com intervalos de 5 a 15 dias. O material foi processado de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura e também submetido à análise química para detecção de compostos de reserva e bixinoides. O óvulo é anátropo, bitegmentado e crassinucelado. O endosperma é nuclear e a semente é bitegmentada. A testa é parenquimatosa e na mesotesta predominam estruturas secretoras de bixina. A principal camada mecânica é o exotégmen, com células de paredes espessadas dispostas em paliçada. Além de açúcares solúveis acumulados na semente, o endosperma acumula lipídio, amido e proteína, e o embrião acumula apenas lipídio e proteína. Não é constada dormência morfológica, uma vez que o embrião já está desenvolvido na semente madura. Há dormência imposta pelo tegumento, como esclerificação e acúmulo de fenólicos no tégmen e tampão calazal. As estruturas secretoras de bixina se formam no mesofilo da testa de sementes em desenvolvimento, a partir de uma célula inicial com núcleo e nucléolo conspícuos, vários vacúolos pequenos e citoplasma denso. Ocorre coalescimento gradativo de células adjacentes e dissolução de paredes que fazem contato entre estas células, estabelecendo-se uma condição cenocítica. Os vacúolos coalescem e formam um espaço central, delimitado por uma faixa citoplasmática periférica, os núcleos degeneram e a secreção acumula-se no centro. O teor de bixinoides atinge o valor máximo de 0,22% aos 90 d.a.a, e se estabiliza.

ABSTRACT

FERREIRA, Clébio Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2012.
Seed and bixin secretory structures development in annatto (*Bixa orellana* L.): anatomical and chemical aspects. Advisor: Marília Contin Ventrella.

The seeds of annatto (*Bixa orellana* L.), that have dormancy, and the bixin glands of the seed coat, are still poorly understood in terms of anatomy, histochemistry and chemistry. This study aimed to characterize the development of annatto seeds and ontogeny of bixin glands through anatomical, micromorphological, histochemical and chemical analysis. Annatto seeds were collected from anthesis to 180 days after anthesis (d.a.a.), with intervals of 5 to 15 days. The material was processed according to standard techniques for light microscopy and scanning electron microscopy and also subjected to chemical analysis for detection of storage compounds and bixinoids. The ovule is anatropous, bitegmic and crassinucellate. The endosperm is nuclear and the seed is bitegmic. The testa is parenchymatous and bixin glands predominate in the mesotesta. The main mechanical layer is exotegmen, composed of thick-walled cells arranged in palisade. In addition to soluble sugars that are accumulated in the seeds, the endosperm accumulates lipid, starch and protein, and the embryo accumulates only lipid and protein. Morphological dormancy is not observed, since the embryo is fully developed in the mature seed. There is dormancy imposed by the seed coat, as sclerified cells and accumulation of phenolic compounds in the tegmen and chalazal plug. Bixin glands are formed in the mesophyll of the testa in developing seeds, from a single initial cell with nucleus and nucleolus conspicuous, several small vacuoles and dense cytoplasm. Gradual coalescence of adjacent cells and dissolution of cell walls of these cells occur, setting up a cenocytic condition. The vacuoles coalesce and form a central space delimited by a band of peripheral cytoplasm, the nuclei degenerate and secretion accumulates in the center. Bixinoids content reaches the maximum value of 0.22% at 90 d.a.a., and stabilizes.

Dedicatória
À minha família pelo amor, carinho e dedicação.
Aos meus mestres e amigos pelos ensinamentos e
formação profissional, pessoal e ética.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela inigualável oportunidade de realização de um sonho e concretização de um objetivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica e a todos os docentes pelos ensinamentos e por toda experiência profissional repassada ao longo do curso.

À Professora Marília Contin Ventrella, pelo apoio, incentivo e principalmente por aceitar o desafio de orientar um projeto a mais de mil e quinhentos quilômetros de distância.

Aos membros da banca Prof^a. Aristéa Alves Azevedo (UFV), Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira (UFMG), Prof. João Paulo Viana Leite (UFV) e Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges (UFV).

Aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial as professoras Aristéa Alves Azevedo, Luzimar Campos da Silva, Marília Contin Ventrella e Renata Maria Strozi Alves Meira, pela estrutura disponível, por todo apoio, ensinamentos e principalmente pela vivência em sala de aula e no laboratório.

Ao Ângelo, amigo e funcionário do Departamento de Biologia Vegetal pelo profissionalismo e dedicação ao curso.

Ao Hugo Rody Vianna Silva, pela imensurável colaboração nas análises do teor de bixina.

Ao professor e aos técnicos do Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, e às estudantes de iniciação científica Thaline Martins Pimenta e a Andréa Lanna Almeida pelo auxílio na quantificação do material de reserva.

Aos técnicos do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Ao professor Paulo César Stringheta, pelo incentivo e inúmeras sugestões durante o decorrer do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Advânio, Ana Claudia, Day, Diego, Dya, Ítalo, Karina, Lorena, Mateus, Naiara, Narah, Nívea, Pedrão, Rafaela, Sarinha, Sarão, Thiaguinho, Tica e Vinicius, pelos momentos de descontração e pela troca diária de conhecimentos.

Ao meu amigo Vitor Peçanha de Miranda Coelho, pelo abrigo e receptividade quando cheguei a Viçosa, pelas dicas e discussões anatômicas, pelos momentos de

descontração e de saudosismo de nosso Nordeste e principalmente pela amizade a mim dedicada.

À minha querida Andrea Lanna Almeida, pela amizade, boa vontade e por sua grande contribuição no processamento do material em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura.

Aos grandes amigos que encontrei em Viçosa e que irei levar pra sempre em pensamentos e no coração, Márcio Flequisson, Bruno Toríbio, Josi Bessa, Josi Rossini, Vanessa Terra, Vanessa Prass, Dona Cida, Flávia, Gláucia e Reinaldo.

Aos amigos nordestinos reencontrados em Viçosa, Madriano e Carol.

Aos meus eternos amigos do LAFF, Prof. Rejane Pimentel, Milena, João, Aurinete, Graça e principalmente a minha saudosa morena, Priscila Gomes Corrêa (*in memoriam*).

À minha imensa família, avó, tios, primos, sogra, cunhado e cunhadas, por me ensinarem o que é o amor. Em especial aos meus pais, Aderaldo e Creuzélia, e ao meu irmão, Cristiano, pelo carinho, confiança e dedicação em toda e qualquer circunstância.

À minha amada esposa, Maria Luiza Paes Santos, por todo amor, carinho, paciência, amizade e tudo mais dedicado a mim nesses dez anos em que estamos juntos.

À minha mais linda flor, Mariana Paes Pereira Ferreira, por me fazer sentir algo que nem em meus mais puros e sinceros sentimentos eu poderia imaginar que tinha... algo tão mágico e indescritível que me enche os olhos de lágrimas e o coração de amor e alegrias.

A Deus, por colocar cada um de vocês em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e acúmulo de reservas em sementes de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	8
Resumo	8
Introdução	9
Material e métodos	10
Material vegetal e coleta	10
Estereomicroscopia	10
Microscopia de luz	10
Análise bromatológica	11
Resultados	12
Estrutura do óvulo	12
Desenvolvimento dos tegumentos	12
Desenvolvimento do nucelo, do endosperma e do embrião	14
Acúmulo de reservas no endosperma e no embrião	15
Discussão	22
Conclusões	24
Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO 2. Desenvolvimento de estruturas secretoras de bixina em sementes de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.): anatomia, histoquímica e fitoquímica	30
Resumo	30
Introdução	31
Material e métodos	32
Material vegetal e coleta	32
Estereomicroscopia	32
Microscopia de luz	32
Microscopia eletrônica de varredura	33
Quantificação de bixinóides	36
Resultados	34
Discussão	41
Conclusões	43
Referências bibliográficas	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48

RESUMO

FERREIRA, Clébio Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2012. **Desenvolvimento de sementes e de estruturas secretoras de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.): aspectos anatômicos e químicos.** Orientadora: Marília Contin Ventrella.

As sementes do urucum (*Bixa orellana* L.), que apresentam dormência, e as estruturas secretoras de bixina do tegumento seminal, ainda são pouco compreendidas do ponto de vista anatômico, histoquímico e químico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento das sementes de urucum e a ontogenia das estruturas secretoras de bixina por meio de análises anatômicas, micromorfológicas, histoquímicas e químicas. Sementes de urucum foram coletadas da antese aos 180 dias após a antese (d.a.a.), com intervalos de 5 a 15 dias. O material foi processado de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura e também submetido à análise química para detecção de compostos de reserva e bixinoides. O óvulo é anátropo, bitegmentado e crassinucelado. O endosperma é nuclear e a semente é bitegmentada. A testa é parenquimatosa e na mesotesta predominam estruturas secretoras de bixina. A principal camada mecânica é o exotégmen, com células de paredes espessadas dispostas em paliçada. Além de açúcares solúveis acumulados na semente, o endosperma acumula lipídio, amido e proteína, e o embrião acumula apenas lipídio e proteína. Não é constada dormência morfológica, uma vez que o embrião já está desenvolvido na semente madura. Há dormência imposta pelo tegumento, como esclerificação e acúmulo de fenólicos no tégmen e tampão calazal. As estruturas secretoras de bixina se formam no mesofilo da testa de sementes em desenvolvimento, a partir de uma célula inicial com núcleo e nucléolo conspícuos, vários vacúolos pequenos e citoplasma denso. Ocorre coalescimento gradativo de células adjacentes e dissolução de paredes que fazem contato entre estas células, estabelecendo-se uma condição cenocítica. Os vacúolos coalescem e formam um espaço central, delimitado por uma faixa citoplasmática periférica, os núcleos degeneram e a secreção acumula-se no centro. O teor de bixinoides atinge o valor máximo de 0,22% aos 90 d.a.a, e se estabiliza.

ABSTRACT

FERREIRA, Clébio Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2012.
**Seed and bixin secretory structures development in annatto (*Bixa orellana* L.):
anatomical and chemical aspects.** Advisor: Marília Contin Ventrella.

The seeds of annatto (*Bixa orellana* L.), that have dormancy, and the bixin glands of the seed coat, are still poorly understood in terms of anatomy, histochemistry and chemistry. This study aimed to characterize the development of annatto seeds and ontogeny of bixin glands through anatomical, micromorphological, histochemical and chemical analysis. Annatto seeds were collected from anthesis to 180 days after anthesis (d.a.a.), with intervals of 5 to 15 days. The material was processed according to standard techniques for light microscopy and scanning electron microscopy and also subjected to chemical analysis for detection of storage compounds and bixinoids. The ovule is anatropous, bitegmic and crassinucellate. The endosperm is nuclear and the seed is bitegmic. The testa is parenchymatous and bixin glands predominate in the mesotesta. The main mechanical layer is exotegmen, composed of thick-walled cells arranged in palisade. In addition to soluble sugars that are accumulated in the seeds, the endosperm accumulates lipid, starch and protein, and the embryo accumulates only lipid and protein. Morphological dormancy is not observed, since the embryo is fully developed in the mature seed. There is dormancy imposed by the seed coat, as sclerified cells and accumulation of phenolic compounds in the tegmen and chalazal plug. Bixin glands are formed in the mesophyll of the testa in developing seeds, from a single initial cell with nucleus and nucleolus conspicuous, several small vacuoles and dense cytoplasm. Gradual coalescence of adjacent cells and dissolution of cell walls of these cells occur, setting up a cenocytic condition. The vacuoles coalesce and form a central space delimited by a band of peripheral cytoplasm, the nuclei degenerate and secretion accumulates in the center. Bixinoids content reaches the maximum value of 0.22% at 90 d.a.a., and stabilizes.

INTRODUÇÃO GERAL

Em todo o mundo, há uma demanda crescente por produtos de origem vegetal que apresentem características tintoriais e possam ser utilizados como corantes naturais em substituição aos corantes sintéticos. *Bixa orellana* L. é uma das espécies cujo uso como corante tem sido estimulado nos últimos anos, principalmente em razão da proibição do uso de corantes sintéticos pelas indústrias, do baixo custo de produção e ausência de toxicidade (Stringheta & Silva, 2008). *Bixa orellana* recebe diversas denominações em todo o mundo e, no Brasil, a espécie é popularmente conhecida como urucum, urucu, colorau, colorífico, açafroa e açafroeira-da-terra (Lorenzi & Matos, 2002). É uma espécie lenhosa nativa da América Tropical, com distribuição das Guianas ao Brasil, sendo bastante cultivada em todos os estados brasileiros, além de outros países, como Índia, Sri Lanka, Java e algumas partes do México (Franco *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2004).

O pigmento avermelhado extraído das sementes de urucum tem se destacado na indústria alimentícia como corante natural para derivados lácteos, embutidos, doces, licores, sorvetes e margarinas, mas também é utilizado nas indústrias farmacêutica, têxtil, de tintas e de cosméticos (Stringheta & Silva, 2008). Além de suas propriedades tintoriais, o urucum é utilizado contra grande variedade de enfermidades na medicina popular (Agra *et al.*, 2007). O pigmento extraído apresenta coloração que varia do amarelo ao castanho escuro, passando por tonalidades de vermelho. O pigmento é composto por carotenoides, dos quais destaca-se a bixina, que tem como provável precursor o licopeno (Stringheta & Silva, 2008). Apesar da bixina ser o carotenoide majoritário e o único de importância econômica nas sementes de urucum, outros carotenoides também podem ser encontrados em menor proporção (Mercadante & Pfander, 1999).

O urucum é uma espécie de difícil propagação vegetativa, que se limita à alporquia e à cultura *in vitro*. No caso da alporquia, o processo é lento e de baixo rendimento, além do sucesso da técnica ser genótipo-dependente (Mantovani *et al.*, 2007). Trabalhos de embriogênese (Paiva Neto *et al.*, 2003) e organogênese (D'Souza & Sharon, 2001; Carvalho *et al.*, 2005; Cruz, 2007) *in vitro* de urucum já foram desenvolvidos, porém a instalação da cultura, tradicionalmente, ainda é feita a partir de plantas propagadas por sementes.

Além da extração dos pigmentos, as sementes de urucum também são utilizadas como componente de rações para suínos (Utiyama, 2001) e aves (Harder, 2005), e neste

último caso, além das reservas da semente, a bixina contida no tegumento intensifica a coloração da gema dos ovos. Nas sementes de urucum e demais Bixaceae o tecido responsável pela proteção do embrião é o tégmen, devido à presença de células em paliçada com paredes espessadas que constituem o exotégmen, enquanto que a testa constitui um tecido especializado na secreção de carotenoides (Kaur, 1969; Corner, 1976; Werker, 1997; Nandi, 1998).

Os trabalhos morfoanatômicos relacionados às sementes de urucum restringem-se a poucas descrições gerais durante o desenvolvimento da semente (Kaur, 1969; Corner, 1976; Werker, 1997), acúmulo de material de reserva no endosperma (Amaral et al., 2001) ou abordam especificamente aspectos relacionados ao tegumento e à dormência tegumentar (Amaral et al., 1995, 2000, 2009; Nandi, 1998; Custódio et al., 2002).

Diversos trabalhos anatômicos e ultraestruturais têm sido conduzidos com o objetivo de identificar e localizar os compostos de reserva e sua compartimentalização em sementes (Prego et al., 1998; Serrato-Valenti, 1998; Otegui et al., 1998, 1999; Corte et al., 2008, 2009), mas ainda há carência de dados para a semente do urucum, especialmente no que se refere à análise conjunta de aspectos anatômicos, histoquímicos e químicos durante as fases iniciais do desenvolvimento.

O urucum apresenta grande quantidade e diversidade de estruturas secretoras, que constituem características diagnósticas da família Bixaceae, como estruturas secretoras de bixina, tricomas peltados, canais de mucilagem (Metcalf & Chalk, 1957, 1983, 1988) e nectários extraflorais (Metcalf & Chalk, 1983, 1988). Os tricomas peltados, os canais de mucilagem e os nectários extraflorais restringem-se à parte aérea da planta, enquanto as estruturas secretoras de bixina estão distribuídas por todo o corpo da planta (Freitas, 2009), e são as únicas estruturas secretoras que também ocorrem nas sementes.

As estruturas secretoras de bixina são denominadas de células secretoras (Metcalf & Chalk, 1957) ou células de pigmento (Kaur, 1969; Corner, 1976), e seriam as estruturas secretoras associadas à produção de bixina no tegumento das sementes, mais especificamente na mesotesta (Werker, 1997; Kubitzki & Bayer, 2002), mas também nos órgãos vegetativos de urucum (Freitas, 2009).

Ainda há lacunas no entendimento morfoanatômico das estruturas secretoras de bixina, que geralmente são descritas brevemente e superficialmente, em fases já avançadas do desenvolvimento (Amaral et al., 2009). Embora as estruturas secretoras de bixina sejam consideradas como células de bixina (Metcalf & Chalk, 1957; Corner, 1976), células

de óleo (Corner, 1976), células de pigmento (Kaur, 1969) ou idioblastos ramificados (Keating, 1970), há indícios de que seja uma estrutura mais complexa, pluricelular e com características muito peculiares (Freitas, 2009). Poucos estudos ontogenéticos das estruturas secretoras de bixina já foram realizados (Kaur, 1969; Freitas, 2009) e apontam para uma estrutura unicelular cenocítica (Kaur, 1969) ou para uma estrutura pluricelular, com degradação de paredes comuns e fusão de protoplastos (Freitas, 2009). A presença de estruturas secretoras de pigmentos, como ocorre em *B. orellana*, é um caráter ímpar, raramente encontrado em vegetais (Fahn, 1979; Evert, 2006), e merece estudos mais detalhados.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar, anatomicamente, o desenvolvimento de sementes e de estruturas secretoras de bixina em *B. orellana*, relacionando com o acúmulo de materiais de reserva e de bixina.

A tese está dividida em dois capítulos: “Desenvolvimento e acúmulo de reservas em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)” e “Desenvolvimento de estruturas secretoras de bixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.): anatomia, histoquímica e fitoquímica”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra, M.F.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(1): 114-140.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 1995. Quebra de dormência em sementes de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 7:151-157.
- Amaral, L.I.V.; Cortelazzo, A.L.; Buckeridge, M.S.; Pereira, L.A.R. & Pereira, M.F.D.A. 2009. Anatomical and biochemical changes in the composition of developing seed coats of annatto (*Bixa orellana* L.). *Trees* 23: 287-293.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 2000. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12(3): 273-285.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 2001. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – Bixaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15:125-132.
- Barroso, G.M; Guimarães, E.F.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Peixoto, A.L. 2004. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. v. 1, 2.ed., Viçosa: Editora UFV.
- Carvalho, J.F.R.P. de; Carvalho, C.R. de; Otoni, W.C. 2005. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. *Revista Árvore* 29:887-895.
- Corner, E.J.H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. v.1, Cambridge: Cambridge University Press.
- Corte, V.B.; Borges, E.E. de L.; Ventrella, M.C.; Leite, I.T. de A.; Braga, A.J.T. 2008. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore* 32:641-650.

- Corte, V.B.; Ventrella, M.C.; Borges, E.E. de L.; Pontes, C.A.; Pinho, D. 2009. Histochemical and ultrastructural study of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae) seeds. *Revista Árvore* 33:873-883.
- Cruz, A.C.F. da. 2007. Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa. 85p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- Custódio, C.C.; Machado-Neto, N.B.; Caseiro, R.F.; Ikeda, M.; Bomfim, D.C. 2002. Germinação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 24:197-202.
- D'Souza, M.C.; Sharon, M. 2001. In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37:168-172.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3. ed. New Jersey: Wiley Interscience, 601p.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press, 302p.
- Franco, C.F.O.; Silva, F.C.P.; Filho, J.C.; Neto, M.B.; José, A.R.S.; Rebouças, T.N.H. ; Fontinelli, I.S.C. 2002. *Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais*. João Pessoa: Emepa, SAIA.
- Freitas, P. F. 2009. Anatomia foliar, ontogenia e histoquímica das estruturas secretoras de *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa (UFV). 95p. Dissertação (Mestrado em Botânica), UFV.
- Harder, M.N.C. 2005. Efeito do urucum (*Bixa orellana*) na alteração de características de ovos de galinhas poedeiras. Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” -Universidade de São Paulo (ESALQ-USP). 74p. Dissertação de Mestrado, ESALQ-USP.
- Kaur, H. 1969. Embryological investigations on *Bixa orellana* LINN. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* 35(6): 487-506.
- Keating, R. C. 1970. Comparative morphology of the Cochlospermaceae. II. Anatomy of the young vegetative shoot. *American Journal of Botany* 57: 889-898.

- Kubitzki, K.; Bayer, C. 2002. The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. 5: Flowering Plants, Dicotyledons: Capparales, Malvales and non-betalain Caryophyllales. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Mantovani, N.; Otoni, W.C.; Grando, M.F. 2007. Produção de explantes através da alporquia para o cultivo *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). Revista Brasileira de Biociências 5:597-599.
- Mercadante, A. Z.; Pfander, H. 1999. Carotenoids from annatto: a review. Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry 2:79-91.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1957. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Oxford: Clarendon Press.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1983. Anatomy of the dicotyledons: Wood structure and conclusion of the general introduction. v.2, 2.ed. Oxford: Clarendon Press.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1988. Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. v.1, 2.ed. Oxford: Clarendon Press.
- Nandi, O.I. 1998. Ovule and seed anatomy of Cistaceae and related Malvaceae. Plant Systematics and Evolution 209: 239-264.
- Otegui, M.; Lima, C.; Maldonado, S.; Lederkremer, R.M. de. 1998. Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. International Journal Plant Science 159:762-772.
- Otegui, M.; Maldonado, S.; Lima, C.; Lederkremer, R.M. de. 1999. Development of the endosperm of *Myrsine laetevirens* (Myrsinaceae). II. Formation of protein and lipid bodies. International Journal Plant Science 160:501-509.
- Paiva Neto, V. B.; Botelho M.N.; Aguiar, R.; Silva, E.A.M.; Otoni, W.C. 2003. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 39:629-634.

- Prego, I.; Maldonado, S.; Otegui, M. 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany* 82:481-488.
- Serrato-Valenti, G.; Mariotti, M.G.; Cornara, L.; Corallo, A. 1998. A histological and structural study of *Phacelia tanacetifolia* endosperm in developing, mature, and germinating seed. *International Journal Plant Science* 159 (5):753-761.
- Stringheta, P.C.; Silva, P.I. 2008. Pigmentos de urucum: extração, reações química, usos e aplicações. Viçosa: Gráfica e Editora Suprema Ltda.
- Utiyama, C.E. 2001. Utilização do resíduo de sementes processadas de urucum (*Bixa orellana* L.) na alimentação de suínos em crescimento. Piracicaba-SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). 74p. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP.
- Werker, E. 1997. Seed anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin. (Handbuch der Pflanzenanatomie).

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e acúmulo de reservas em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)

RESUMO – As sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) apresentam dormência e ainda são pouco estudadas anatomicamente, embora a principal forma de propagação da cultura seja a partir de sementes. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento e o acúmulo de material de reserva de sementes de urucum, por meio de análises anatômicas, histoquímicas e bromatológicas. Sementes de urucum foram coletadas em diferentes fases de desenvolvimento, desde a antese até 180 dias após a antese, com intervalos de 5 a 15 dias. O material foi processado de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e submetido à análise bromatológica para detecção de amido, açúcares solúveis, lipídios e proteínas. O óvulo é anátropo, bitegmentado e crassinucelado. O tegumento externo é composto por 3-5 camadas de células e o tegumento interno por 4-6 camadas, que não proliferam durante o desenvolvimento das sementes, apenas dividem-se anticlinalmente. O endosperma é nuclear e a celularização se inicia quando o embrião está passando do estágio globular para cordiforme e as células do nucelo se encontram degradadas. A semente é bitegmentada e tégmica. A testa é parenquimatosa e com predomínio de estruturas secretoras de bixina. A principal camada mecânica é uma camada de células esclerificadas em paliçada que constitui o exotégmen, mas o restante do tégmen também apresenta esclerificação e acumulam compostos fenólicos. O endosperma acumula lipídio, amido e proteínas, enquanto o embrião acumula prioritariamente lipídios e proteínas. Açúcares solúveis também são acumulados nas sementes. O acúmulo de proteínas é mais tardio que o acúmulo de lipídio e amido. As sementes maduras podem ser consideradas sem dormência morfológica, uma vez que o embrião já está completamente desenvolvido e circundado pelo endosperma rico em reservas. A dormência é imposta por características do tegumento, como esclerificação e acúmulo de compostos fenólicos no tégmen e formação de tampão calazal.

Palavras-chave: endosperma, reserva, tegumento seminal

INTRODUÇÃO

Bixa orellana L. (Bixaceae), conhecida como urucum ou colorau, tem sido muito utilizada como corante natural pela indústria alimentícia e de cosmético, pela presença de um pigmento avermelhado, extraído do tegumento das sementes (Stringheta & Silva, 2008). As sementes apresentam dormência física (Amaral et al., 1995), o que dificulta a propagação sexuada, e a propagação vegetativa também é difícil, se limitando à alporquia e à cultura *in vitro*. No caso da alporquia, o processo em *B. orellana* é lento e de baixo rendimento, além do sucesso da técnica ser genótipo-dependente (Mantovani et al., 2007). Trabalhos de embriogênese (Paiva Neto et al., 2003) e organogênese (D'souza & Sharon, 2001; Carvalho et al., 2005; Cruz, 2007) *in vitro* de *B. orellana* já estão sendo desenvolvidos, porém a instalação da cultura, tradicionalmente, ainda é feita a partir de sementes.

A anatomia e a histoquímica são ferramentas úteis para a identificação de características que possam estar relacionadas à dormência física e à dormência morfológica de sementes (Iwanowska et al., 1994; Oliveira & Paiva, 2005; Briggs et al., 2005; Wang & Grusak, 2005; Jayasuriya et al., 2007; Orozco-Segovia et al., 2007; Jordaan, 2011). Ao lado das análises químicas, a anatomia e a histoquímica também permitem a localização de compostos de reserva (Prego et al., 1998; Otegui et al., 1998; Corte et al., 2008) e o acompanhamento do acúmulo de reservas (Jakobsern et al., 1994; Otegui et al., 1999) durante o desenvolvimento das sementes.

Apesar da dormência e da produção de um pigmento natural de interesse nas sementes, os trabalhos morfoanatômicos relacionados ao desenvolvimento das sementes de *B. orellana* são escassos (Kaur, 1969; Corner, 1976). Trabalhos anatômicos mais aplicados, que avaliam o acúmulo de material de reserva (Amaral et al., 2001) ou características do tegumento (Amaral, 1995, 2000, 2009; Custodio et al., 2002) de sementes de *B. orellana* são restritos a algumas fases do desenvolvimento. Portanto, ainda há necessidade de estudos a respeito das sementes de *B. orellana*, especialmente a análise conjunta de aspectos anatômicos, histoquímicos e bromatológicos.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as sementes de *B. orellana*, com ênfase no desenvolvimento e no acúmulo de material de reserva.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e coleta

Foram utilizadas plantas de *Bixa orellana* L., genótipo M1, com aproximadamente 20 anos de idade, cultivadas no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob nº 31977.

Ovários de flores em antese e frutos em diferentes fases de desenvolvimento foram coletados entre os meses de janeiro de 2010 a dezembro de 2011, e tiveram seu desenvolvimento acompanhado desde a antese até a abertura dos frutos, mediante marcação de flores e frutos com etiquetas datadas. As coletas ocorreram a cada cinco dias, da antese até 30 d.a.a. (dias após a antese) e, posteriormente, a cada 15 dias até completar 180 d.a.a.

Estereomicroscopia

As estereomicrografias de óvulos e sementes em desenvolvimento foram obtidas em estereomicroscópio acoplado a câmera digital (AxioCam ERc 5S, Zeiss) e programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal e em estereomicroscópio (Olympus SZX7) acoplado a câmera digital (Olympus e-330) no Laboratório de Cultura de Tecidos do BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Microscopia de luz (ML)

Análise estrutural: o material foi fixado em glutaraldeído 2,5% ou FAA₅₀, por 48 horas (Johansen, 1940), e estocado em etanol 70%. As amostras ($\leq 0,125 \text{ cm}^3$) foram incluídas em metacrilato (Historesin – Leica[®]), de acordo com Paiva et al. (2011). O material emblocado foi seccionado, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 μm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) e montado entre lâmina e lamínula com resina sintética (Permout[®]). Parte do material fixado também foi seccionado em criomicrotomo, corado com safrablau e montado com gelatina glicerinada.

Análise histoquímica: foram realizados testes histoquímicos em material fresco ou fixado em FAA₅₀ sem inclusão, seccionados em criomicrotomo, e também com material incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo de avanço automático, com 5 μm . Os corantes e reagentes usados foram: lugol (Johansen, 1940) para amido, sudan

black B (Pearse, 1980) para lipídios, ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) (Maia, 1979) para polissacarídeos neutros, vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para substâncias pécticas, Xylidine Ponceau (Vidal, 1977) para proteínas, cloreto férrico (Johansen, 1940) para compostos fenólicos, vanilina clorídrica (Mace & Howell, 1974) para taninos condensados, reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981) para alcaloides.

Registro de imagens: as fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio (Mod. AX70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) acoplado a câmera digital (AxioCan HRc, Zeiss) e microcomputador com o programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss), no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Análise bromatológica

Sementes inteiras foram coletadas aos 75, 90, 105, 120, 150 e 180 d.a.a e processadas para a determinação de lipídios, proteínas solúveis, açúcares solúveis e amido, no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. As avaliações foram feitas em três replicatas por tratamento. Foram calculadas a média e o desvio padrão.

As sementes foram secas em estufa a 45 °C, por 72 h para a determinação do peso da massa seca, e armazenadas em vidros e congeladas até a extração e quantificação das reservas.

Determinação dos lipídios: a extração e quantificação de lipídios foi realizada em aparelho tipo Soxhlet, pelo método de extração a frio com éter de petróleo por 24 h (Silva, 1990).

Determinação de proteínas solúveis: a extração de proteínas foi realizada com tampão TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,5 como solução de extração (Alfenas et al., 1991). A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Determinação de açúcares solúveis e amido: a extração de açúcares solúveis foi realizada em banho-maria por 30 minutos a 75 °C (Buckeridge & Dietrich, 1990). Após a extração, a mistura foi centrifugada, retirando-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em estufa a 45 °C, por 48 h, e submetido à digestão do amido com 1 mL de ácido perclórico 35% (Passos, 1996). Os açúcares solúveis e o amido foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), usando-se glicose (Sigma) como padrão.

RESULTADOS

Estrutura do óvulo

Os óvulos de flores em antese de *Bixa orellana* são anátropos (Figura 1A-C), bitegumentados, e crassinucelados (Figura 1D-E). O tegumento externo (Figura 1G-H) é constituído por quatro a cinco camadas de células: epiderme externa com células alongadas radialmente, mesofilo com duas a três camadas de células vacuolizadas e volumosas e algumas estruturas secretoras de bixina já diferenciadas (Figura 1A-B), e epiderme interna com células com citoplasma denso e menores que as demais. O tegumento externo é vascularizado pelo feixe rafeal que parte do ovário (Figura 1F-G). O tegumento interno (Figura 1G-H) é constituído por quatro a seis camadas de células: epiderme externa e epiderme interna com células pequenas, cuboides e de citoplasma denso, e mesofilo com duas a quatro camadas de células mais vacuolizadas. O número de camadas de células do tegumento externo e interno aumenta consideravelmente na região calazal e micropilar (Figura 1E-F). A micrópila é reta, formada pelo exostômio e endostômio (Figura 1D-E). O feixe rafeal chega até a calaza ainda como um cordão procambial em diferenciação (Figura 1F). O nucelo é pluriestratificado, composto por células pequenas, com citoplasma denso e núcleo e nucléolos conspícuos, e saco embrionário na região central (Figura 1G-H).

Desenvolvimento dos tegumentos

Poucas modificações estruturais ocorrem nos tegumentos durante o desenvolvimento da semente até 20 dias após a antese (Figura 2A-B). Na testa, as células da exotesta encontram-se vacuolizadas e alongadas tangencialmente, a mesotesta apresenta maior número de estruturas secretoras de bixina e a endotesta ainda apresenta células densas e alongadas radialmente (Figura 2B). No tégmen, as células da exotesta mantêm citoplasma denso; as células da mesotesta estão mais vacuolizadas e expandidas tangencialmente, e há acúmulo de compostos fenólicos na hipoderme externa, assim como nas células da endotesta (Figura 2B). Aos 25 d.a.a., o desenvolvimento do arilo a partir da proliferação de células do funículo, próximo à micrópila, ainda é inconspícuo, e as estruturas secretoras de bixina são mais abundantes e diferenciadas na região micropilar que na região calazal (Figura 2C). A região da calaza encontra-se bastante elaborada aos 25 d.a.a., formada pela extensão dos tegumentos que se curvam para o interior da semente, terminações vasculares do feixe

vascular rafeal mais diferenciadas e grupos de células com compostos fenólicos que constituem a hipóstase (Figura 2D).

Aos 45 d.a.a. (Figura 2E-G) as principais modificações estruturais na testa são o alongamento radial discreto e o acúmulo de grãos de amido nas células da endotesta e, no tégmen, grande alongamento radial das células do exotégmen (Figura 2E). As camadas medianas do mesotégmen também apresentam grãos de amido, e as células da hipoderme interna apresentam discreto alongamento radial e afunilamento da região mediana das paredes radiais (Figura 2E). Neste estágio, o alongamento radial das células do exotégmen torna a região da calaza mais dilatada tangencialmente (Figura 2F) e, na região da micrópila, o arilo torna-se mais conspícuo (Figura 2G).

Dos 45 aos 60 d.a.a. as principais modificações observadas nos tegumentos são o aumento de grãos de amido, principalmente na endotesta e o aumento do alongamento radial das células do exotégmen, que adquirem o aspecto de paliçada (Figura 2H). Também ocorre acúmulo de amido nas células das camadas medianas do mesotégmen e espessamento das paredes radiais na região mediana das células da hipoderme interna que começam a adquirir formato de ampulheta (Figura 2H). Aos 75 d.a.a. o arilo está mais diferenciado, porém permanece como uma estrutura rudimentar, constituído por células parenquimáticas sem acúmulo de lipídios, proteínas ou amido (Figura 2I).

Aos 90 d.a.a. as estruturas secretoras de bixina que estão mais avolumadas, coalescidas e próximas umas das outras, ocupam a maior proporção da testa, que ainda apresenta grãos de amido (Figura 2J-K). No tégmen, as células do exotégmen atingem seu alongamento radial máximo e iniciam o espessamento das paredes radiais (Figura 2K). O espessamento das paredes radiais das células em ampulheta da hipoderme interna do mesotégmen também se intensifica. Há grãos de amido nas células do exotégmen, nas camadas mais externas do mesotégmen e no endotégmen (Figura 2K). Nas células do endotégmen há início de espessamento das paredes periclinais internas e anticlinais em forma de “U” (Figura 2K).

Aos 105 d.a.a. não há alterações estruturais conspícuas na testa e, no tégmen, nota-se maior espessamento das paredes das células do exotégmen, da hipoderme interna do mesotégmen e do endotégmen (Figura 2L). No tégmen, os grãos de amido não são mais observados no exotégmen e se restringem à hipoderme externa e às camadas medianas do mesotégmen, que estão colapsadas (Figura 2L).

A partir dos 120 d.a.a. (Figura 3A-E) não ocorrem mais grãos de amido nos tegumentos (Figura 3A), que se encontram estruturalmente definidos, e as alterações que ocorrem até os 150 d.a.a. são inconspícuas (Figura 3F-J). O arilo rudimentar

permanece inalterado (Figura 3C), e a região calazal, bastante complexa (Figura 3D-E), apresenta rupturas a partir dos 150 d.a.a. (Figura 3F-G, I). A rafe expande-se pouco em relação ao restante da semente, e é visualizada como uma reentrância longitudinal na semente (Figura 3C). Na testa, a exotesta é composta por células pequenas, achatadas e de paredes delgadas, revestidas por cutícula muito delgada; a mesotesta é composta por poucas células parenquimatosas e inúmeras estruturas secretoras de bixina, que atingem seu volume máximo e alto grau de coalescência neste estágio, e a endotesta é composta por células eretas e de paredes delgadas (Figura 3A-C, J, H). O tégmen é marcadamente esclerificado (Figura 3A-B), embora apenas o exotégmen, que é constituído por células de paredes anticlinais espessadas, em paliçada, seja lignificado, inclusive na região calazal (Figura 3G-H). A lignificação é tênue, e não se altera até o final do desenvolvimento das sementes. O mesotégmen apresenta hipoderme externa com acúmulo de compostos fenólicos, camadas centrais colapsadas e hipoderme interna com células de paredes espessadas em forma de ampulheta; e o endotégmen é composto por células com espessamentos em “U” e também acumula compostos fenólicos (Figura 3B). A esclerificação dos tegumentos e o acúmulo de compostos fenólicos (Figura 3D-F) estendem-se à região calazal e micropilar. Lipídios também se acumulam na região calazal correspondente ao mesotégmen (Figura 3I).

As últimas alterações estruturais do tegumento são observadas na testa aos 180 d.a.a. (Figura 3K-L). Neste estágio, as células da exotesta e da endotesta estão colapsadas e o mesofilo preenchido por estruturas secretoras de bixina volumosas entre células menores pouco especializadas, dando ao tegumento um microrrelevo ondulado e consistência tenra. O arilo rudimentar se desprende da semente madura (Figura 3K), juntamente com o funículo, não participando do processo de dispersão.

Desenvolvimento do nucelo, do endosperma e do embrião

Da antese até o início da formação do endosperma, as células do nucelo tornam-se mais vacuolizadas e expandem-se consideravelmente, acompanhando a expansão da semente e do saco embrionário (Figura 4A-B). O nucelo não apresenta reservas lipídicas, protéicas ou amiláceas. O embrião globular só é observado em sementes com aproximadamente 45 d.a.a., período em que o endosperma cenocítico se estende na periferia do saco embrionário como um cordão multinucleado, a partir do pólo micropilar (Figura 4B-D). O nucelo persiste até o início da celularização do endosperma, por volta dos 75 d.a.a. (Figura 4E). As células do nucelo ficam colapsadas

entre o tegumento interno e o endosperma que é celularizado e prolifera centripetamente.

A celularização do endosperma coincide com um pico no desenvolvimento do embrião que, aos 85 d.a.a., já apresenta cotilédones em expansão (Figura 4F). A expansão dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula é intensa até os 150 d.a.a. (Figura 4G-J). Nesse estágio, embrião já está estruturalmente desenvolvido, com eixo hipocótilo-radícula reto e cilíndrico, plúmula pouco diferenciada e cotilédones delgados e levemente dobrados no terço distal (Figura 4I-J).

Acúmulo de reservas no endosperma e no embrião

O acúmulo de reservas do endosperma e do embrião (Figura 5) inicia-se entre 80 e 90 d.a.a., período em que o embrião apresenta cotilédones em expansão, e é intenso até 150 d.a.a., quando o embrião já está maduro.

O endosperma acumula lipídio, amido e proteína (Tabela 1). Lipídio é o primeiro composto a se acumular, e está presente em todas as células do endosperma desde os 90 d.a.a. (Figura 5A, D, G, J). O amido começa a se acumular no mesmo período, como grãos de amido simples, mas não ocorrem nas camadas mais externas do endosperma (Figura 5B, E, H, K). Proteínas são detectadas histoquimicamente a partir dos 105 d.a.a., mas ocorre um acúmulo gradativo até os 150 d.a.a., quando os corpos protéicos são visualizados em todas as células do endosperma (Figura 5B, E, H, K).

No embrião, há acúmulo predominante de lipídio e proteína (Tabela 1). Lipídio é o primeiro composto a se acumular, por volta dos 90 d.a.a., acompanhando a expansão dos cotilédones e do eixo embrionário (Figura 5A, D, G, J). Assim como no endosperma, as proteínas só são detectadas histoquimicamente a partir dos 90 dias, e ocorre acúmulo gradativo até os 180 d.a.a., quando corpos protéicos repletos de proteína são visualizados (Figura 5C, F, I, L). Ocasionalmente, grãos de amido muito diminutos, como grãos de amido primário, também podem ser encontrados nas células do embrião.

A análise bromatológica da semente de urucum confirma a presença de lipídios, proteínas e amido, além de açúcares solúveis (Figura 6). Amido e açúcares solúveis atingem valores máximos (8,30 e 1,05 mg gli/g ms respectivamente) aos 150 d.a.a. Lipídios e proteínas atingem valores máximos (264,17 e 0,63 mg/g ms, respectivamente) apenas aos 180 d.a.a. Apenas o amido diminui no final do desenvolvimento das sementes, de 150 a 180 d.a.a., enquanto açúcares solúveis e proteínas aumentam nesse mesmo período.

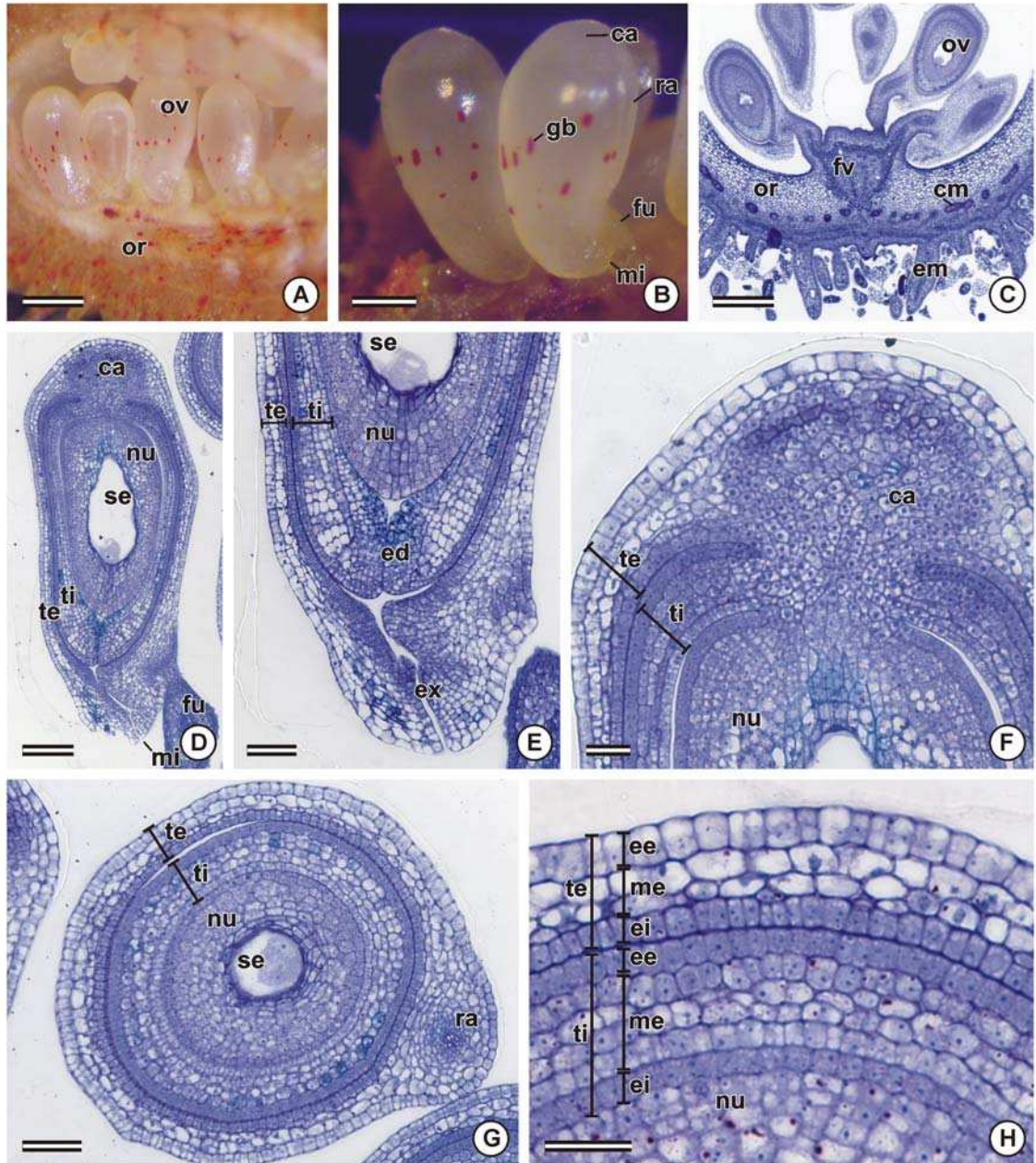


Figura 1. Óvulos de flores em antese de *Bixa orellana*. A-B, estereofotomicrografias. C-H, fotomicrografias de seções transversais (C, G-H) e longitudinais (D-F) coradas com azul de toluidina. A-D, aspecto geral dos óvulos. E, detalhe da região micropilar. F, detalhe da região calazal. G, região equatorial do óvulo. H, detalhe dos tegumentos e do nucelo. ca, calaza; ed, endóstoma; ee, epiderme externa; ei, epiderme interna; em, emergência; en, endosperma; ex, exóstoma; fv, feixe vascular; fu, funículo; gb, glândula de bixina; me, mesofilo; mi, micrópila; nu, nucelo; ov, óvulo; or, ovário; ra, rafe; se, saco embrionário; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Barra = 300 μm (A, C), 150 μm (B), 100 μm (D), 50 μm (E, G), 25 μm (F, H).

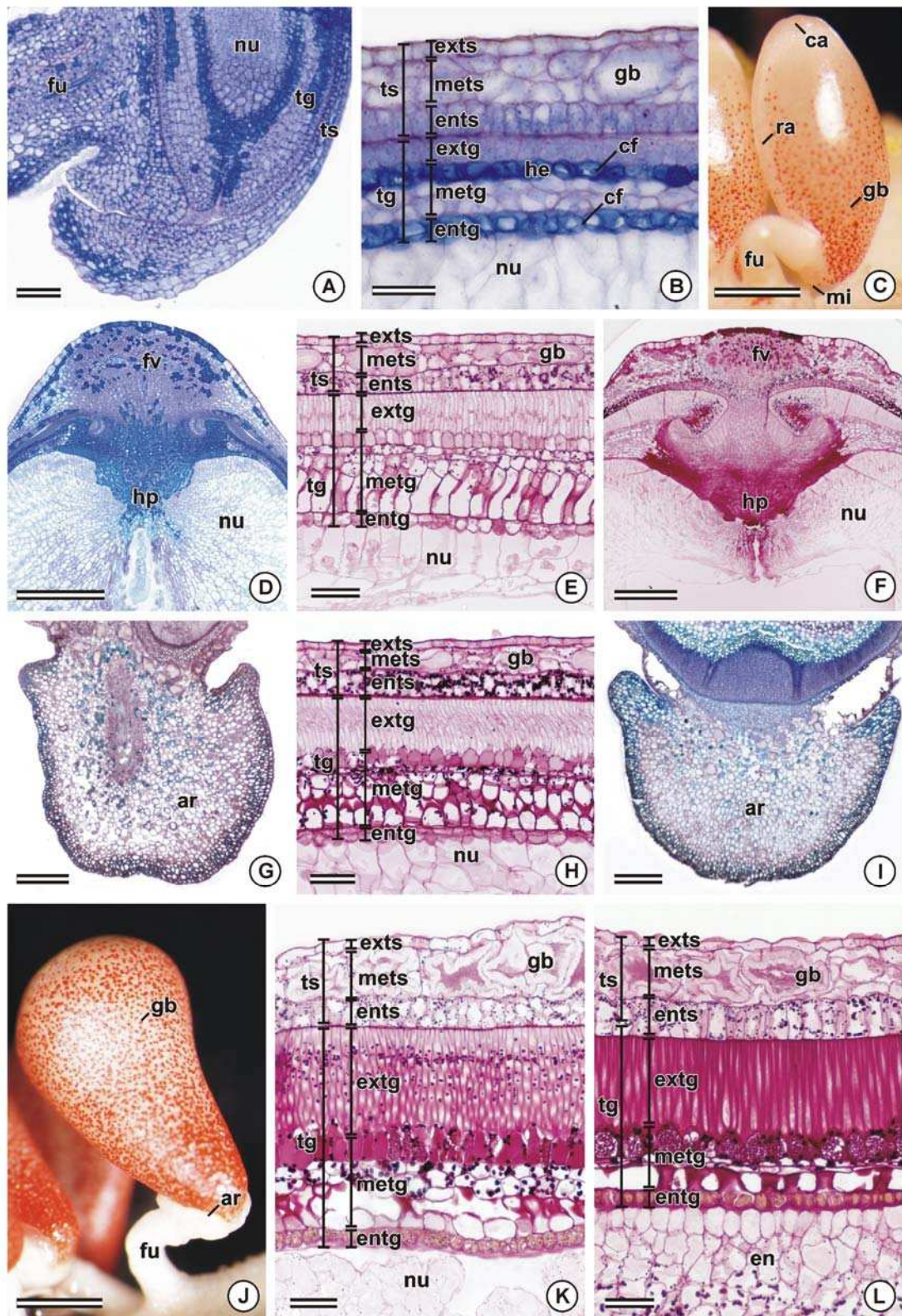


Figura 2. Sementes de *Bixa orellana* aos 10 (A), 20 (B), 25 (C-D), 45 (E-G), 60 (H), 75 (I-J), 90 (K) e 105 (L) dias após a antese. A-B, D-I, K-L, fotomicrografias de seções longitudinais coradas com azul de toluidina (A-B, D, G, I), onde a coloração azul-esverdeada indica compostos fenólicos, e coradas com PAS (E-F, H, K-L), onde a coloração magenta indica polissacarídeos. C, J, estereofotomicrografias. A, G, I, região micropilar. B, E, H, K, L, detalhe dos tegumentos. C, J, aspecto geral da semente. D, F, região calazal. ar, arilo; ca, calaza; cf, compostos fenólicos; en, endosperma; entg, edotégmen; ents, endotesta; extg, exotégmen; exts, exotesta; fv, feixe vascular; fu, funículo; gb, glândula de bixina; hp, hipóstase; metg, mesotégmen; mets, mesotesta; mi, micrópila; nu, nucelo; ra, rafe; tg, tégmen; ts, testa. Barra = 50 μ m (A, E, H, K, L), 25 μ m (B), 250 μ m (C, F, G, I).

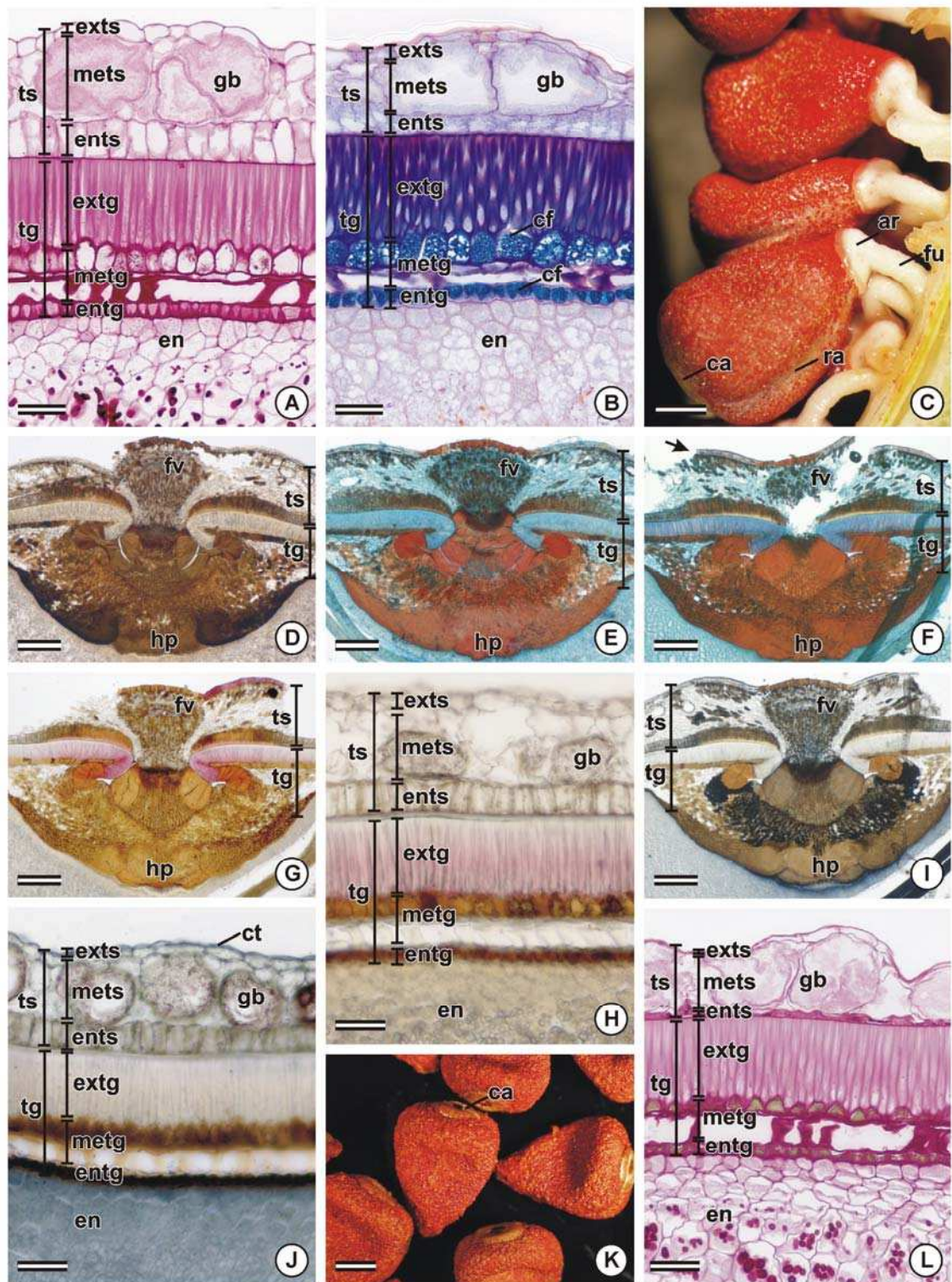


Figura 3. Sementes de *Bixa orellana* aos 120 (A-E), 150 (F-J) e 180 (K-L) dias após a antese. A-B, D-K, fotomicrografias de seções longitudinais dos tegumentos (A-B, J-K) e da região calazal (D-H). C, L, estereofotomicrografias das sementes. A, K, corado com PAS; coloração magenta indica polissacarídeos. B, corado com azul de toluidina; coloração esverdeada indica compostos fenólicos. D, reação com cloreto férrico; coloração marrom a negra indica compostos fenólicos. E-F, corado com safranblau; coloração avermelhada indica compostos fenólicos. Seta indica ruptura da região calazal. G-H, corado com floroglucina ácida; coloração rosada indica lignina. I-J, corado com sudan black B; coloração azul escura indica lipídios. ar, arilo; ca, calaza; cf, compostos fenólicos; ct, cutícula; en, endosperma; entg, edotégmen; ents, endotesta; extg, exotégmen; exts, exotesta; fv, feixe vascular; fu, funículo; gb, glândula de bixina; hp, hipóstase; metg, mesotégmen; mets, mesotesta; ra, rafe; tg, tégmen; ts, testa. Barra = 50 µm (A-B, H, J, L), 300 µm (D-G, I), 2 mm (C, K).

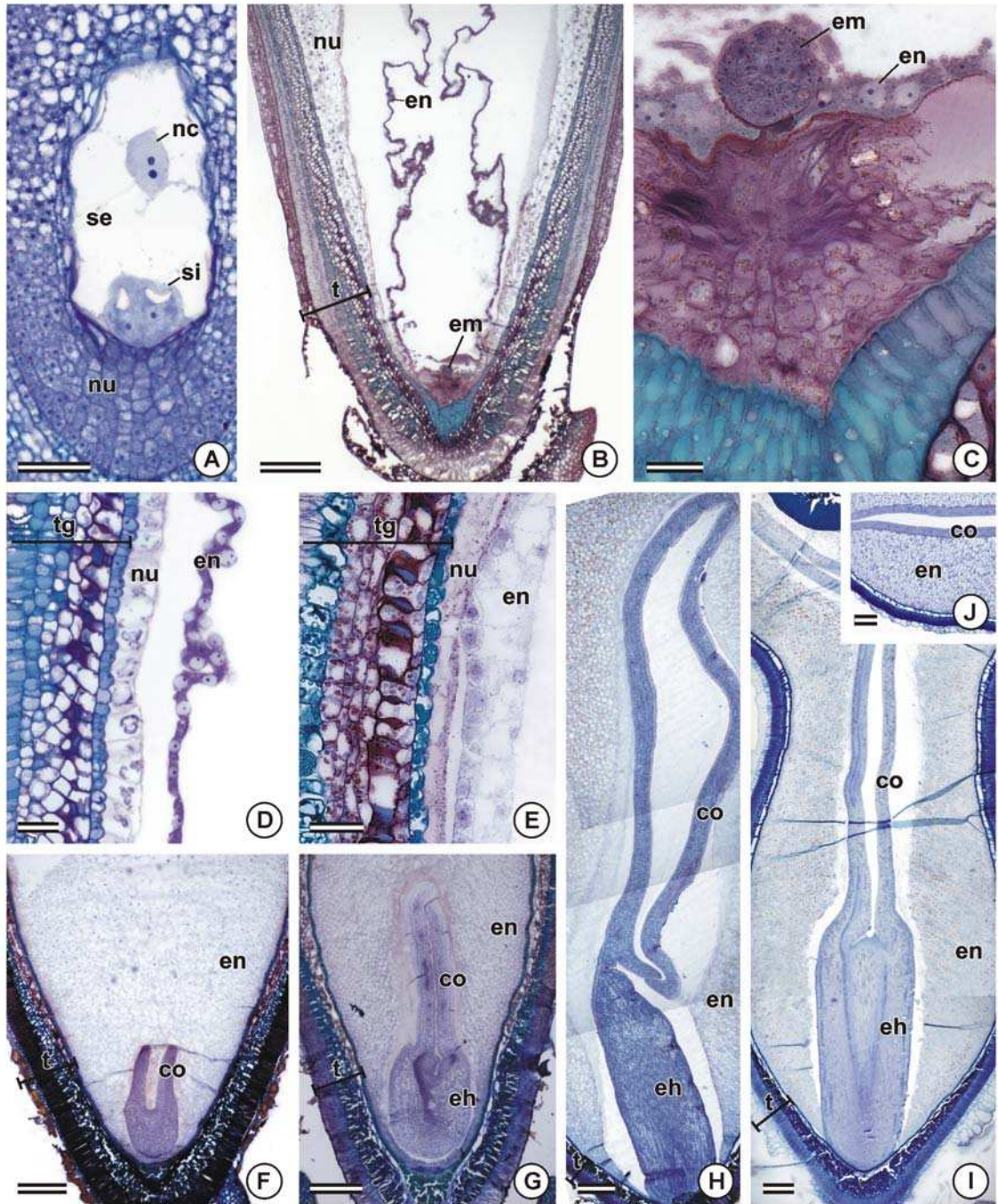


Figura 4. Desenvolvimento do endosperma e do embrião de sementes de *Bixa orellana*. A-J, fotomicrografias de seções longitudinais (A-I) e transversais (J) do óvulo de flor em antese (A) e de sementes aos 45 (B-D), 75 (E), 85 (F), 90 (G), 120 (H) e 150 (I-J) dias após a antese, coradas com azul de toluidina (A, D, J) ou com azul de toluidina e lugol (B-C, E-I). A, aspecto geral do saco embrionário. B-D, semente com embrião na fase globular e endosperma cenocítico. B, aspecto geral da região micropilar. C, detalhe do embrião e do endosperma em formação. D, detalhe do nucelo remanescente e do endosperma nuclear. E, semente com embrião na fase cordiforme; detalhe do nucelo em degeneração e endosperma em celularização. F-H, semente com embrião na fase cotiledonar. I-J, semente com embrião maduro. co, cotilédone; eh, eixo hipocótilo-radícula; em, embrião; en, endosperma; nu, nucelo; nc, núcleos da célula média; se, saco embrionário; si, sinérgide; t, tegmentos; tg, tégmen. Barra = 50 μ m (A, D, E), 250 μ m (B, F-J), 25 μ m (C).

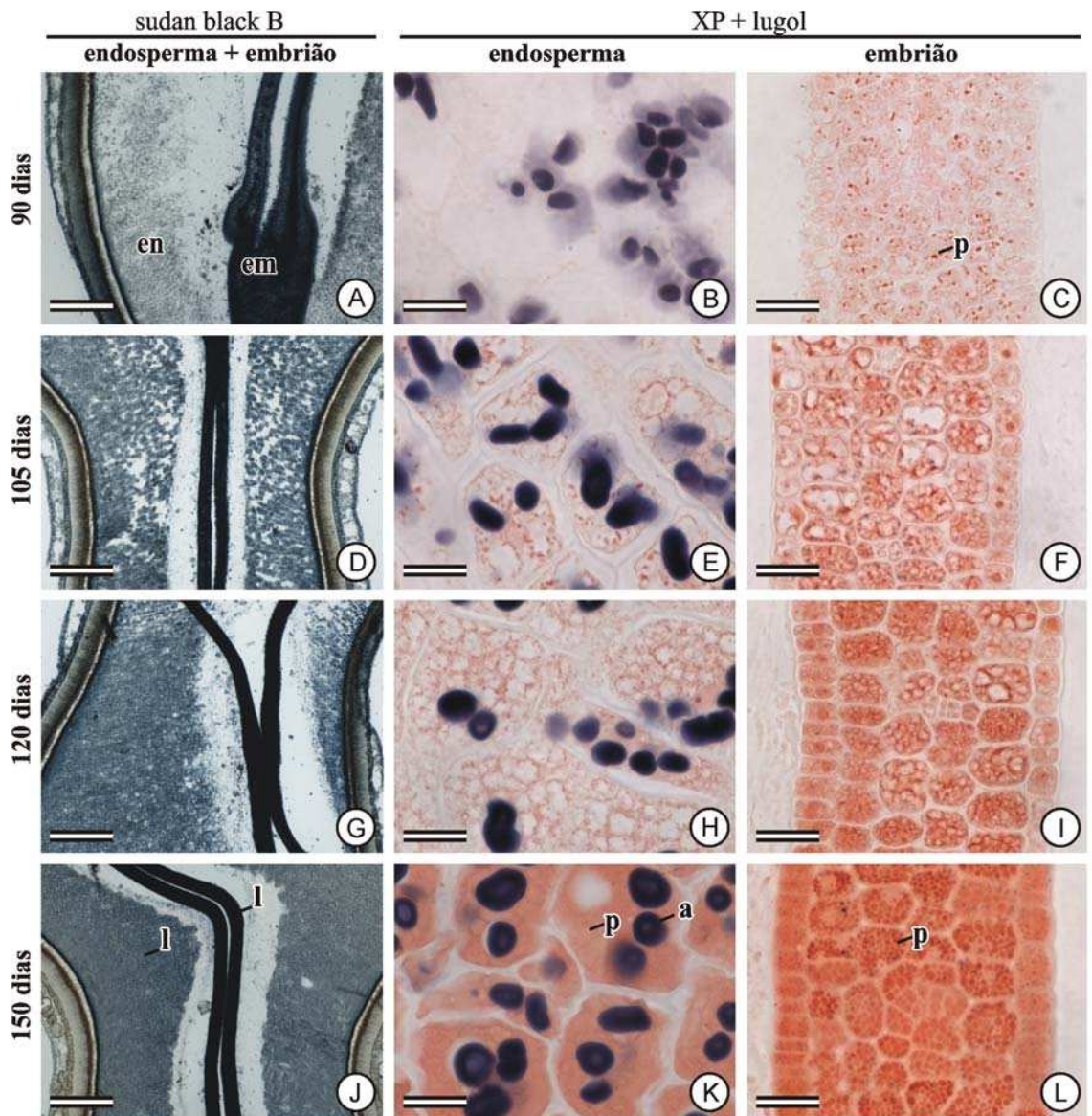


Figura 5. Acúmulo de reservas em sementes de *Bixa orellana* aos 90 (A-C), 105 (D-F), 120 (G-I), 150 (J-L) dias após a antese (fotomicrografias). A, D, G, J, seções longitudinais da semente coradas com sudan black B; coloração azul escura indica lipídios. B-C, E-F, H-I, K-L, seções transversais do endosperma (B, E, H, K) e do embrião (C, F, I, L) coradas com xylidine ponceau (XP); coloração avermelhada indica proteínas, e lugol; coloração negra indica grãos de amido. a, amido, l, lipídio; em, embrião; em, endosperma; p, proteína. Barra = 400 μm (A, D, G, J), 20 μm (B-C, E-F, H-I, K-L).

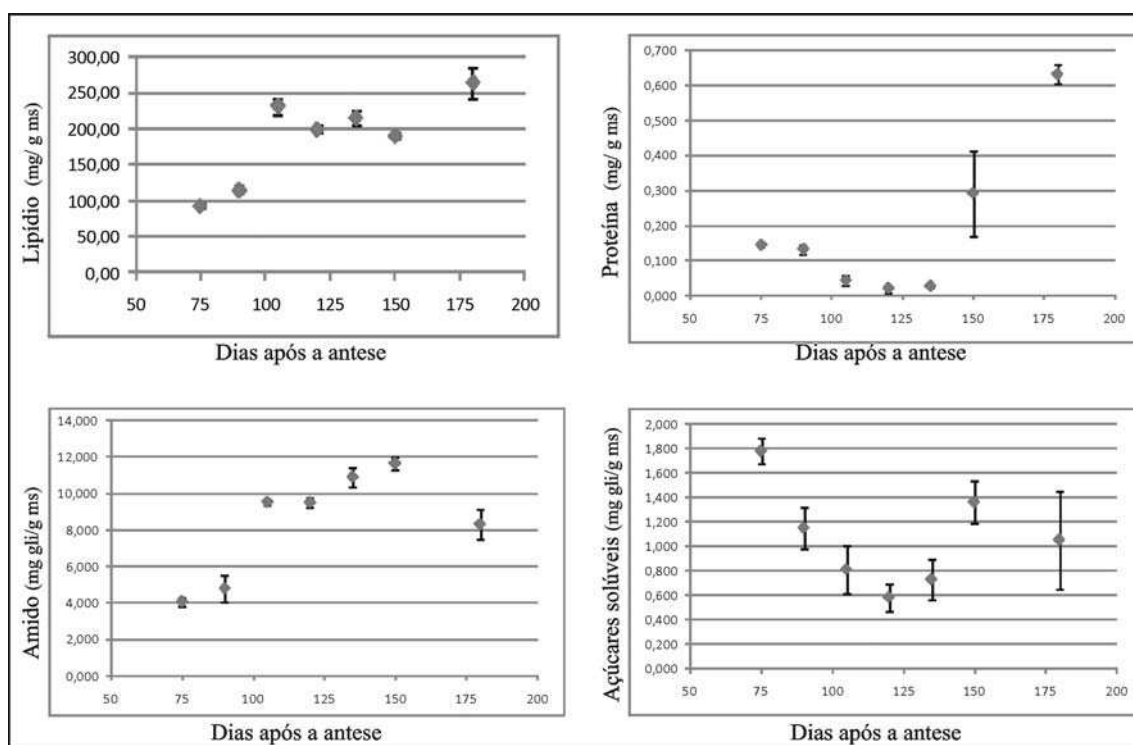


Figura 6. Acúmulo de material de reserva durante o desenvolvimento de sementes de *Bixa orellana*.

Tabela 1. Análise histoquímica da semente de *Bixa orellana*.

Compostos	Corantes/reagentes	Endosperma	Embrião	Tegumento
Lipídios	Sudan IV	+	+++	-
Proteínas	Xylidine ponceau (XP)	+	++	-
Amido	Reagente de Lugol	+++	+	+*
Polissacarídeos (inclusive amido)	PAS	+++	+	+
Compostos fenólicos	Azul de toluidina	-	-	+
	Cloreto férrico	-	-	+
Lignina	Floroglucina ácida	-	-	+

(+) presença; (-) ausência; * nas fases iniciais do desenvolvimento.

DISCUSSÃO

A semente de *Bixa orellana* é considerada ortodoxa, pois apresenta dormência física relacionada à impermeabilidade do tegumento (Amaral et al., 1995; Amaral et al., 2009; Baskin et al., 2000). Embora comercialmente indesejável, a recalcitrância é uma característica adaptativa que possibilita a germinação da semente apenas em períodos propícios para o estabelecimento do indivíduo (Bradford & Nonogaki, 2007).

A quebra da dormência das sementes de *B. orellana* pode ocorrer pela escarificação mecânica ou química, o que permite a entrada de água na semente (Amaral et al., 1995) pela eliminação de barreiras mecânicas do tegumento seminal.

O tegumento seminal de *B. orellana* é essencialmente tégmico, pois há camadas de tecido mecânico na epiderme externa, mesofilo e epiderme interna do tégmen. Como a principal camada mecânica é o exotégmen, formado por uma camada de células em paliçada com paredes espessadas, a semente de *B. orellana* pode ser classificada como exotégmica (Kaur, 1969; Corner, 1976; Nandi, 1998). O tégmen também apresenta duas camadas de células ricas em compostos fenólicos, no mesotégmen e no endotégmen, que poderiam contribuir para a inibição da germinação das sementes (Bradford & Nonogaki, 2007; Tokuhisa et al., 2007).

A região calazal das sementes de *B. orellana* é bastante elaborada, contando com a terminação dos tegumentos encurvadas para o interior, terminação do feixe rafeal e uma região mais central com células ricas em compostos fenólicos e lipídios, compondo a hipóstase (Nandi, 1998). A hipóstase também poderia ser considerada como uma barreira à entrada de água na semente, atuando como um tampão calazal (Baskin et al., 2000).

Pode-se considerar que a dormência física das sementes de *B. orellana* (Amaral et al., 1995) seja resultado de um somatório de resistências mecânicas e químicas do tegumento que dificultariam a entrada de água e garantiriam o caráter ortodoxo da semente (Kaur, 1969; Corner, 1976; Nandi, 1998; Baskin et al., 2000). Essas resistências seriam a presença de camadas de células esclerificadas no tégmen, especialmente o exotégmen, acúmulo de compostos fenólicos no mesotégmen e no endotégmen e formação de tampão calazal.

O aumento do volume das sementes, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento, deve-se à expansão do tegumento e do nucelo. O número de camadas de células que compõem o tegumento seminal não se altera com o desenvolvimento, e

as células dividem-se prioritariamente no plano anticlinal, apenas aumentando o número de células em cada camada. Embrião e endosperma em desenvolvimento só ocupam um volume significativo da cavidade seminal a partir dos 90 d.a.a., quando o embrião está alongando os cotilédones e as reservas começam a ser efetivamente acumuladas, respondendo pelo volume final da semente.

O endosperma é do tipo nuclear (Corner, 1976; Lersten, 2004) e a celularização só se inicia por volta dos 45 dias, momento em que as células do nucelo remanescente começam a ser reabsorvidas. Na semente madura, a cavidade seminal é ocupada pelo endosperma e pelo embrião completamente desenvolvido, ambos ricos em reservas. Portanto, a dormência morfológica, caracterizada pela presença de embrião pouco desenvolvido na semente (Bewley & Black, 1982), não é constatada nesta espécie.

Na semente de *B. orellana*, há a formação de um pequeno arilo brancacento próximo à micrópila, de origem funicular. Embora a presença de arilo relacione-se com o processo de dispersão em muitas sementes (Paoli, 2006), em *B. orellana* o arilo é pequeno e discreto, sendo considerado vestigial (Corner, 1976). Além disso, o arilo das sementes de *B. orellana* não permanece conectado às sementes maduras, o que sugere que não participe do processo de dispersão das sementes. Sementes de coloração vermelha geralmente são dispersas por animais (Paoli, 2006), como provavelmente são dispersas as sementes de *B. orellana*. O aspecto avermelhado e papiloso que a semente madura apresenta é resultado da proliferação das estruturas secretoras de bixina na mesotesta. Algumas estruturas secretoras são formadas durante o desenvolvimento dos óvulos, mas a grande maioria se forma durante o desenvolvimento da semente, no sentido micrópila-calaza (Kaur, 1969). A especialização da testa para a produção de pigmentos carotenóides, como a bixina, e a grande quantidade de lipídios como material de reserva estariam relacionadas com a dispersão zoocórica das sementes (Paoli, 2006).

As sementes de *B. orellana* apresentam lipídios, amido e proteínas como materiais de reserva, como demonstra o resultado das análises histoquímicas e químicas, embora muitos autores considerem-na simplesmente como semente amilácea (Kaur, 1969; Corner, 1976), ou amilo-protéica (Amaral et al., 2001; 2009), negligenciando as porções protéica e, ou lipídica. O início do acúmulo de reservas no endosperma e no embrião coincide com a fase final da morfogênese do embrião. Lipídios se acumulam intensamente, nas células do endosperma e do embrião, enquanto o amido acumula-se de forma conspícua apenas no endosperma. Nas células do embrião, eventualmente, são encontrados grãos de amido diminutos, que provavelmente atuariam como uma forma transitória de reserva. Uma intensa mobilização de amido também pode ser observada

durante o desenvolvimento dos tegumentos da semente de *B. orellana*. O período de maior deposição de amido nos tegumentos coincide com as fases de expansão e deposição de parede secundária das células do tégmen, sugerindo que o amido seja um produto intermediário, como em sementes de *Arabidopsis* (Windsor et al., 2000). As proteínas têm acúmulo mais tardio nas sementes de *B. orellana* que os lipídios e o amido, mas ocorre de forma sincronizada no endosperma e no embrião.

Embora o presente trabalho tenha utilizado datas para a definição de fases do desenvolvimento da semente de *B. orellana*, deve-se considerar que o desenvolvimento pode ser influenciado pelo genótipo e por fatores ambientais. Isso pode justificar a grande discordância de datas que se verifica entre trabalhos que analisam maturidade fisiológica (Kato et al., 1992) e índices de germinação (Amaral et al., 2000; Mendes et al., 2005) de sementes de *B. orellana*.

CONCLUSÕES

A semente de *B. orellana* é bitegumentada, com endosperma de formação nuclear e embrião desenvolvido. A testa é vermelha, parenquimatosa e com predomínio de estruturas secretoras de bixina, e a principal camada mecânica é o exotégmen, composto por uma camada de células alongadas radialmente, com paredes espessadas, em paliçada. O endosperma acumula lipídio, amido e proteínas, enquanto o embrião acumula prioritariamente lipídios e proteínas. O acúmulo de proteínas é mais tardio que o acúmulo de lipídio e amido.

As sementes maduras podem ser consideradas sem dormência morfológica, uma vez que o embrião já está completamente desenvolvido e circundado pelo endosperma rico em reservas, mas com dormência imposta por características do tegumento, como esclerificação e acúmulo de compostos fenólicos no tégmen e formação de tampão calazal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C.; Peters, I.; Brune, W.; Passador, G.C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa:SIF.
- Amaral, L.I.V.; Cortelazzo, A.L.; Buckeridge, M.S.; Pereira, L.A.R. & Pereira, M.F.D.A. 2009. Anatomical and biochemical changes in the composition of developing seed coats of annatto (*Bixa orellana* L.). *Trees* 23: 287-293.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 1995. Quebra de dormência em sementes de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 7:151-157.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 2000. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12(3):273-285.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 2001. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – Bixaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15:125-132.
- Baskin, J.M.; Baskin, C.C.; Li, X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15: 139-152.
- Bewley, J.D.; Black, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: viability, dormancy and environmental control. Berlin:Springer-Verlag.
- Bradford, K.J.; Nonogaki, H. 2007. Seed development, dormancy and germination. *Annual plant reviews*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Briggs, C.L.; Morris, E.C.; Ashford, A.E. 2005. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. sericea*: anatomy and histochemistry of the seed coat. *Annals of Botany* 96: 965–980.

- Buckeridge, M.S.; Dietrich, S.M.C. 1990. Galactomanans from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13:109-112.
- Corner, E.J.H. 1976. The seeds of dicotyledons. v.1, Cambridge: Cambridge University Press.
- Corte, V.B.; Borges, E.E. de L.; Ventrella, M.C.; Leite, I.T. de A.; Braga, A.J.T. 2008. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore* 32:641-650.
- Custódio, C.C.; Machado-Neto, N.B.; Caseiro, R.F.; Ikeda, M.; Bomfim, D.C. 2002. Germinação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 24:197-202.
- D'Souza, M.C.; Sharon, M. 2001. In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37:168-172.
- Dubois, M.K.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Ribers, P.A.; Smith, T. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Furr, M.; Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44(2):153-159.
- Iwanowska, A.; Tykarska, T.; Kuras, M.; Zobel, A.M. 1994. Localization of phenolic compounds in the covering tissues of the embryo of *Brassica napus* (L.) during different stages of embryogenesis and seed maturation. *Annals of Botany* 74: 313-320.
- Jakobsern, H.B.; Martens, H.; Lyshede, O.B. 1994. Accumulation of metabolites during seed development in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 409-415.
- Jayasuriya, K.M.G.G., Baskin, J.M.; Geneve, R.L.; Baskin, C.C. 2007. Seed development in *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae), with particular reference to anatomy of the water gap. *Annals of Botany* 100: 459–470.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.

- Jordaan, A. 2011. Seed coat development, anatomy and scanning electron microscopy of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw), Pedaliaceae. South African Journal of Botany 77: 404–414.
- Kato, O.R.; Figueirêdo, F.J.C.; Belfort, A.J.L.; Nogueira, O.L.; Barbosa, W.C. Época de colheita de sementes de urucu: emergência e teor de corantes. Pesquisa agropecuária brasileira 27(9): 1291-1302.
- Kaur, H. 1969. Embryological investigations on *Bixa orellana* Linn. Proceedings of the National Institute of Sciences of India 35(6): 487-506.
- Lersten, N.R. 2004. Flowering plant embryology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Mace, M.E.; Howell, C.R. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. Canadian Journal of Botany 52: 2423-26.
- Maia, V. 1979. Técnica histológica. São Paulo: Atheneu.
- Martin, C.; Smith, A.M. 1995. Starch biosynthesis. The Plant Cell 7: 971-985.
- Mantovani, N.; Otoni, W.C.; Grando, M.F. 2007. Produção de explantes através da alporquia para o cultivo *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). Revista Brasileira de Biociências 5:597-599.
- Mendes, A.M.S.; Figueiredo, A.F.; Silva, J.F. 2005. Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum. Revista Brasileira de Sementes 27(2): 25-34.
- Nandi, O.I. 1998. Ovule and seed anatomy of Cistaceae and related Malvaceae. Plant Systematics and Evolution 209: 239-264.
- O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373.
- Oliveira, D. M. T.; Paiva, E. A. S. 2005. Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. Brazilian Journal of Biology 65: 483-494.
- Orozco-Segovia, A.; Márquez-Guzmán, J.; Sánchez-Coronado, M.E.; Gamboa de Buen, A.; Baskin, J.M.; Baskin, C.C. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) Annals of Botany 99: 581–592.

- Otegui, M.; Lima, C.; Maldonado, S.; Lederkremer, R.M. de. 1998. Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. *International Journal Plant Science* 159:762-772.
- Otegui, M.; Maldonado, S.; Lima, C.; Lederkremer, R.M. de. 1999. Development of the endosperm of *Myrsine laetevirens* (Myrcinaceae). II. Formation of protein and lipid bodies. *International Journal Plant Science* 160:501-509.
- Paiva Neto, V. B.; Botelho M.N.; Aguiar, R.; Silva, E.A.M.; Otoni, W.C. 2003. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39:629-634.
- Paiva, E.A.S.; Pinho, S.Z.; Oliveira, D.M.T. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.) *Light microscopy: methods and protocols*. New York, Springer/Humana Press. 37-49. (Methods in Molecular Biology, n. 689).
- Paoli, A.A.S. 2006. Semente. In: Souza, L.A. de (org.) *Anatomia do fruto e da semente*. Editora UEPG, Ponta Grossa. 200p.
- Passos, L.P. 1996. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco.
- Pearse, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. 4.ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. vol. 2.
- Prego, I.; Maldonado, S.; Otegui, M. 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany* 82:481-488.
- Silva, D.J. 1990. *Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Stringheta, P.C.; Silva, P.I. 2008. Pigmentos de urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações. Gráfica e Editora Suprema Ltda., Viçosa.
- Tokuhisa, D.; Dias, D.C.F.S.; Alvarenga, E.M.; Hilst, P.C.; Demuner, A.J. 2007. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 29(3): 180-188.

- Vidal, B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22: 45-64.
- Wang, H.L.; Grusak, M. A. 2005. Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. *Annals of Botany* 95: 737–747.
- Windsor, J.B.; Symonds, V.V.; Mendenhall, J.; Lloyd, A.M. 2000. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal* 22(6): 483-493.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de estruturas secretoras de bixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.): anatomia, histoquímica e fitoquímica

Resumo – O pigmento avermelhado produzido nas sementes de *Bixa orellana*, conhecida como urucum ou colorau, é a bixina, muito utilizada como corante natural. O pigmento é sintetizado em estruturas secretoras presentes no tegumento seminal, ainda são pouco compreendidas do ponto de vista anatômico e histoquímico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a ontogenia das estruturas secretoras de bixina em sementes de *B. orellana*, da antese à maturação das sementes, por meio de análise anatômica, histoquímica e espectrofotométrica. Sementes de urucum foram coletadas em diferentes fases de desenvolvimento, desde a antese até 180 dias após a antese (d.a.a.), com intervalos de 5 a 15 dias. O material foi processado de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura e também submetido à análise em espectrofotômetro para a quantificação de bixinóides. A estrutura secretora de bixina começa a se formar no mesofilo do tegumento externo de óvulos em desenvolvimento, a partir de uma célula inicial com núcleo e nucléolo conspícuos, vários vacúolos pequenos e citoplasma denso, e progride com o coalescimento com células adjacentes. A coalescência ocorre pela dissolução de paredes que fazem contato entre células adjacentes e manutenção das paredes externas e vários núcleos, estabelecendo-se uma condição cenocítica. Há a formação de um espaço central delimitado por uma faixa citoplasmática periférica, os núcleos degeneram e a secreção acumula-se na região central. A incorporação de novas células e a coalescência de estruturas secretoras já diferenciadas ocorre até os estádios finais do desenvolvimento das sementes. O teor de bixinóides aumenta de 0,08 % aos 45 d.a.a. a 0,22% aos 90 d.a.a, quando se estabiliza. As estruturas secretoras de bixina ou glândulas de bixina apresentam processo ontogenético e tipo de secreção incomuns quando comparados às estruturas secretoras mais freqüentes em plantas.

Palavras-chave: anatomia, estrutura secretora, glândula, pigmento, teor de bixinóide

INTRODUÇÃO

Bixa orellana L., popularmente conhecida como urucum, possui sementes de tegumento avermelhado muito utilizadas pela indústria alimentícia e cosmética como corante natural, bem como especiaria e na medicina popular (Prance, 1976; Lorenzi e Matos, 2008). O pigmento avermelhado que dá a coloração característica às sementes é a bixina, um apocarotenoide, até o momento registrado apenas para essa espécie (Penna e Pogson, 2006; Stringheta et. al., 2008), produzido e acumulado em estruturas secretoras (Kaur, 1969; Corner, 1976; Metacalfe e Chalk, 1950). Também ocorrem outros carotenoides nas sementes de *B. orellana*, como β -caroteno, criptoxantina, luteína e de zeaxantina, mas a bixina é o carotenóide majoritário (Tirimanna, 1981; Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002), e representa cerca de 80% dos carotenóides totais (Preston & Rickard, 1980).

As estruturas secretoras de bixina formam-se, principalmente, no tegumento externo das sementes (Corner, 1976; Kaur, 1969), mas também estão distribuídas pelos órgãos vegetativos de *B. orellana* (Freitas, 2009). Essas estruturas secretoras de bixina são classificadas como células de bixina (Metacalfe e Chalk, 1950; Corner, 1976), células de óleo (Corner, 1976), células de pigmento (Kaur, 1969) ou idioblastos ramificados (Keating, 1970). Todas essas classificações são questionáveis e se devem à escassez de estudos ontogenéticos e ultraestruturais que permitam melhor entendimento da estrutura secretora de bixina. Na ontogenia das estruturas secretoras de bixina presentes em órgãos vegetativos de *B. orellana*, como raízes, caules e folhas, Freitas (2009) demonstrou que a origem é unicelular e o desenvolvimento pluricelular, com degradação de paredes comuns e fusão de protoplastos, de forma escalonada, o que representa um padrão ímpar de desenvolvimento quando comparado com o desenvolvimento de cavidades, canais, idioblastos ou laticíferos. Trabalhos mais detalhados sobre o desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina em sementes de *B. orellana* ainda são necessários para o entendimento dessa estrutura secretora tão incomum.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a ontogenia das estruturas secretoras de bixina em sementes de *B. orellana*, da antese à maturação das sementes, utilizando técnicas de microscopia de luz (análise estrutural e histoquímica), microscopia eletrônica de varredura (análise micromorfológica) e espectrofotometria (quantificação de bixinoides).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e coleta

Foram utilizados óvulos e sementes de *Bixa orellana* L. em diferentes fases de desenvolvimento, coletados de plantas com aproximadamente 20 anos de idade, cultivadas no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob nº 31977.

As coletas ocorreram a cada cinco dias, da antese até 30 dias após a antese (d.a.a.) e, posteriormente, a cada 15 dias até 180 d.a.a., mediante marcação de flores e frutos com etiquetas datadas, entre 2010 e 2011.

Estereomicroscopia

As estereomicrografias de óvulos e sementes em desenvolvimento foram obtidas em estereomicroscópio acoplado a câmera digital (AxioCam ERc 5S, Zeiss) e programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Microscopia de luz (ML)

Análise estrutural: o material foi fixado em glutaraldeído 2,5% ou FAA₅₀, por 48 horas (Johansen, 1940), e estocado em etanol 70%. As amostras ($\leq 0,125 \text{ cm}^3$) foram incluídas em metacrilato (Historesin – Leica[®]), de acordo com Paiva et al. (2011). O material embocado foi seccionado, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 μm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) para metacromasia e montado entre lâmina e lamínula com resina sintética (Permount[®]).

Análise histoquímica: foram realizados testes histoquímicos em material sem inclusão (fresco ou fixado em FAA₅₀), seccionados em criomicrotomo, e também com material incluído em metacrilato como na análise estrutural. Os corantes e reagentes usados foram: lugol (Johansen, 1940) para amido, sudan black B (Pearse, 1980) para lípidios, reagente NADI (David & Carde, 1964) para óleos essenciais e óleorresinas; ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) (Maia, 1979) para polissacarídeos neutros, vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para substâncias pécticas, Xylidine Ponceau (XP)

(Vidal, 1977) para proteínas, cloreto férrico (Johansen, 1940) para compostos fenólicos, reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981) para alcaloides.

Registro de imagens: as fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio (Mod. AX70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) acoplado a câmera digital (AxioCan HRc, Zeiss) e microcomputador com o programa de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss), no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material foi fixado em FAA₅₀, por 48 horas, e estocado em etanol 70%. As amostras foram embebidas em glicerol 30% por 24 horas, congeladas com N₂ líquido e fraturadas com auxílio de bisturi. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em série cetônica e secas até o ponto crítico com uso de CO₂ líquido (CPD 020, Bal-Tec, Balzers). As amostras secas foram metalizadas com ouro por meio de pulverização catódica (FDU 010, Bal-Tec, Balzers) e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo 1430VP, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Quantificação de bixinoides

Bixinoides totais (bixina, norbixina e seus isômeros) foram quantificados em sementes de *B. orellana* com 45, 60, 75, 90, 105, e 120 d.a.a., no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Extrações e análise em espectrofotômetro foram realizadas de acordo com Silva (2007) e Stringheta et al. (2008).

As extrações foram realizadas com clorofórmio como meio extrator, na proporção de 1:6 (p/v), ao abrigo da luz, a 25°C, por 1 h. Ao término das extrações, os extratos foram filtrados e o solvente evaporado. Os corantes obtidos foram pesados, armazenados em frascos de vidro âmbar e estocados em freezer (-18 ± 2°C) para as análises espectrofotométricas.

Os teores de pigmentos (bixinoides totais) foram determinados em espectrofotômetro (UV-1600 Pró Análise), após diluição em acetona. Utilizou-se comprimento de onda de máxima absorção de 485 nm e coeficiente de absorvidade de 3.140 e absorbância entre 0,2 e 0,8. Para a determinação do teor de pigmento foi

empregada a fórmula: % bixinoides = $(\text{abs} \times d)/3,140$ (g/100g), onde abs é a absorção da amostra em 485 nm, e d é o fator de diluição.

RESULTADOS

Óvulos de flores em antese de *Bixa orellana* já apresentam algumas estruturas secretoras de bixina ou glândulas de bixina diferenciadas na região mediana, no mesofilo do tegumento externo, e estas continuam a se desenvolver até a maturação das sementes aos 180 d.a.a. (Figura 1). Porém, a maioria das células do mesofilo do tegumento externo ainda se encontram como células indiferenciadas ou como células iniciais que gerarão as estruturas secretoras de bixina.

Aos 20 d.a.a., muitas estruturas secretoras de bixina estão em fase inicial de formação na mesotesta, cuja diferenciação segue o sentido micrópila-calaza.

Cada estrutura secretora de bixina começa a se formar a partir de uma célula inicial, que apresenta características distintas das demais células adjacentes, como núcleo e nucléolo conspícuos, vários vacúolos de tamanho reduzido e citoplasma denso (Figura 2A). O desenvolvimento da estrutura secretora progride com a coalescência da célula inicial com células adjacentes (Figura 2B). A coalescência ocorre pela dissolução de paredes que fazem contato entre a célula inicial e a célula adjacente que está sendo incorporada. As paredes externas se mantêm, passando a delimitar um citoplasma comum, com vários núcleos e nucléolos conspícuos, e vários vacúolos (Figura 2C-D). Nesse estágio, a estrutura secretora em formação é um cenócito (Figura 2A-D). Os vacúolos coalescem na região central da estrutura secretora e se forma um espaço central e uma faixa periférica de citoplasma. Nesse estágio, os núcleos estão em processo de degeneração (Figura 2D-F).

Dos 45 aos 60 d.a.a., as estruturas secretoras de bixina ainda ocupam pequena proporção da testa, mas já se encontram em processo de secreção. Na estrutura secretora, a faixa citoplasmática torna-se mais contraída em direção à parede celular que a delimita, há secreção no espaço central e grãos de amido distribuídos nas demais células da testa, especialmente a endotesta (Figura 2G-H). Gradativamente, as estruturas secretoras de bixina se avolumam, seja pela incorporação de novas células à estrutura em formação, seja pelo coalescimento entre estruturas secretoras adjacentes, obedecendo ao mesmo padrão: dissolução das paredes entre estruturas secretoras

adjacentes, manutenção das demais paredes e de uma faixa citoplasmática periférica (Figura 2H).

Dos 75 aos 90 d.a.a., os grãos de amido também são encontrados no tégmen, que apresenta células totalmente expandidas e em processo de espessamento de parede celular. Nesse período, estruturas secretoras de bixina diferenciadas e em processo de secreção predominam na mesotesta, e aumentam de volume pela coalescência entre estruturas secretoras adjacentes ou pela incorporação de novas células (Figuras 3A-B, 4A).

Aos 105 dias, estruturas secretoras de bixina continuam a se avolumar na testa e ainda há amido presente na endotesta. A secreção presente nas estruturas secretoras de bixina, de coloração natural avermelhada (Figura 1), é composta por polissacarídeos (Figura 3C) e lipídios (Figura 3D). Proteínas são identificadas pelo teste com xilidine Ponceau apenas na faixa citoplasmática periférica, mas não na secreção (Figura 3E). Grãos de amido, terpenos, alcaloides e compostos fenólicos não foram identificados na secreção.

Aos 120 d.a.a. os tegumentos seminiais estão estruturalmente diferenciados, e o amido já foi consumido (Figuras 3F, 4B-D). Dos 120 aos 150 d.a.a. (Figuras 3F-G, 4E) as estruturas secretoras de bixina continuam a coalescer e atingem o volume final. A porção citoplasmática periférica torna-se mais delgada e altera-se quimicamente, passando a reagir positivamente nos testes para polissacarídeos de maneira mais intensa que a secreção, que ocupa um volume maior das estruturas secretoras de bixina (Figura 3F-G). Aos 180 d.a.a., predomina o colapso de células da testa, especialmente da exotesta e da endotesta, e muitas estruturas secretoras de bixina apresentam paredes celulares em processo de degradação (Figuras 3H, 4F).

O teor de bixinoides (Figura 5) nas sementes de *B. orellana* variou de 0,08 %, aos 45 d.a.a., a 0,22 %, aos 90 d.a.a. A partir dos 90 d.a.a., o teor de pigmentos decresce, chegando a 0,08% aos 105 d.a.a., estabilizando até o final do desenvolvimento das sementes.

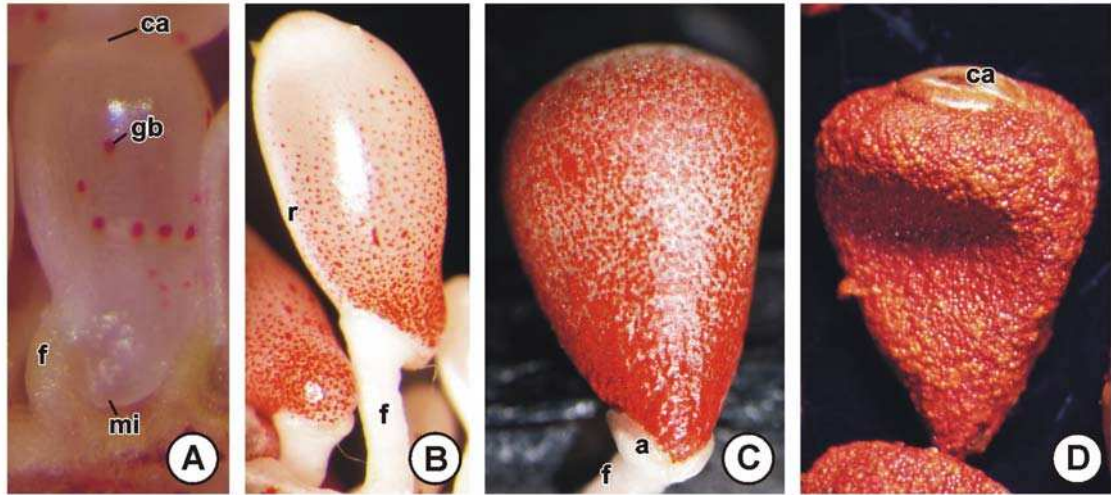


Figura 1. Óvulos (A) e sementes de *Bixa orellana* aos 30 (B), 120 (C) e 150 (D) dias após a antese (estereofotomicrografias). A, arilo; ca, calaza; f, funículo; gb, glândula de bixina; mi, micrópila; r, rafe. Barra = x μ m (A-E).

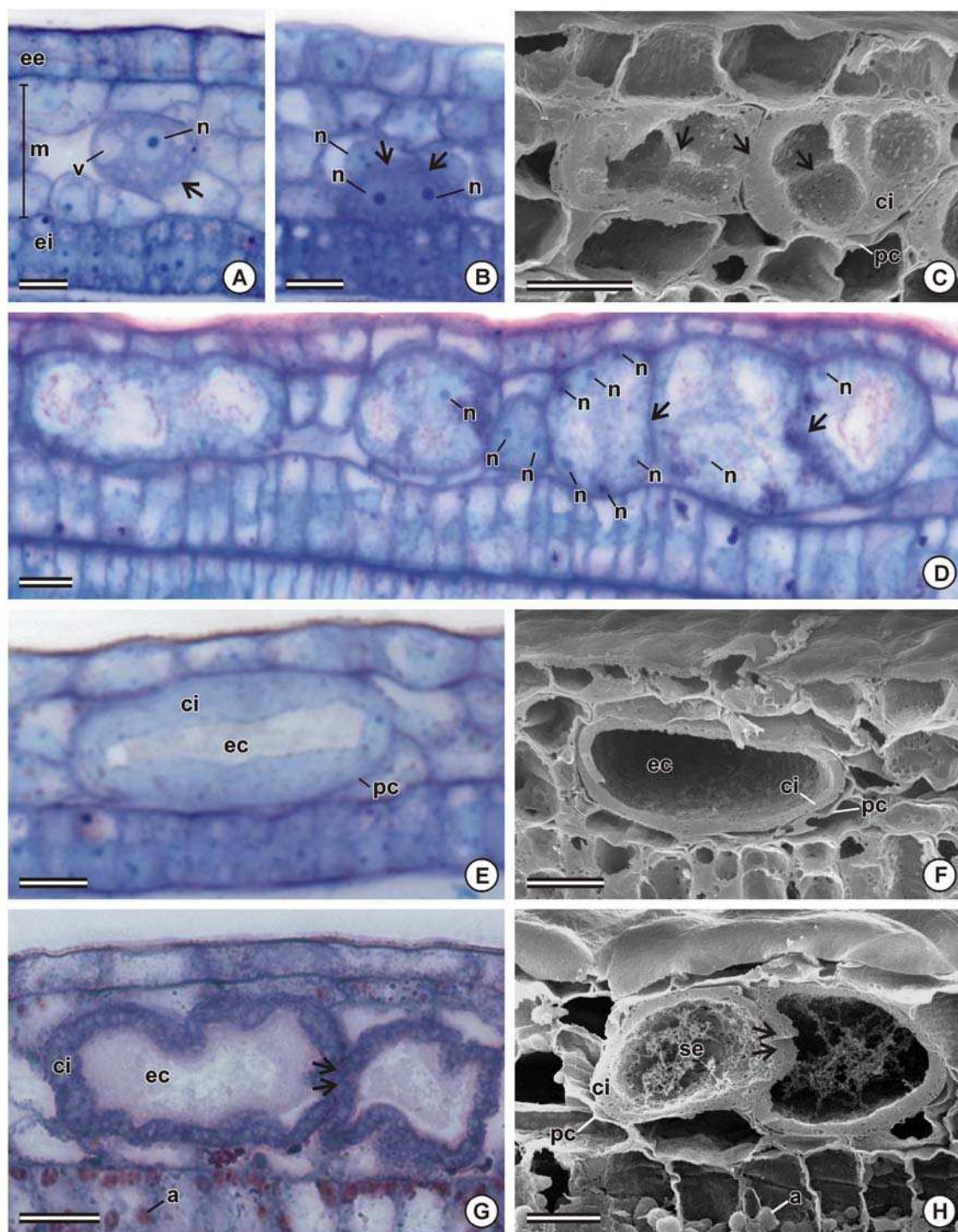


Figura 2. Desenvolvimento de glândulas de bixina no tegumento externo de sementes de *Bixa orellana* aos 20 (A-E), 30 (F), 45 (G) e 60 (H) dias após a antese. A-B, D-E, G, seções transversais coradas com azul de toluidina (fotomicrografias). C, F, H, eletromicrografias de varredura. Setas indicam paredes celulares em degradação. A, amido; ci, citoplasma; ec, espaço central; ee, epiderme externa; ei, epiderme interna; m, mesofilo; nu, núcleo; pc, parede celular; v, vacúolo. Barra = 10 μ m (A-H).

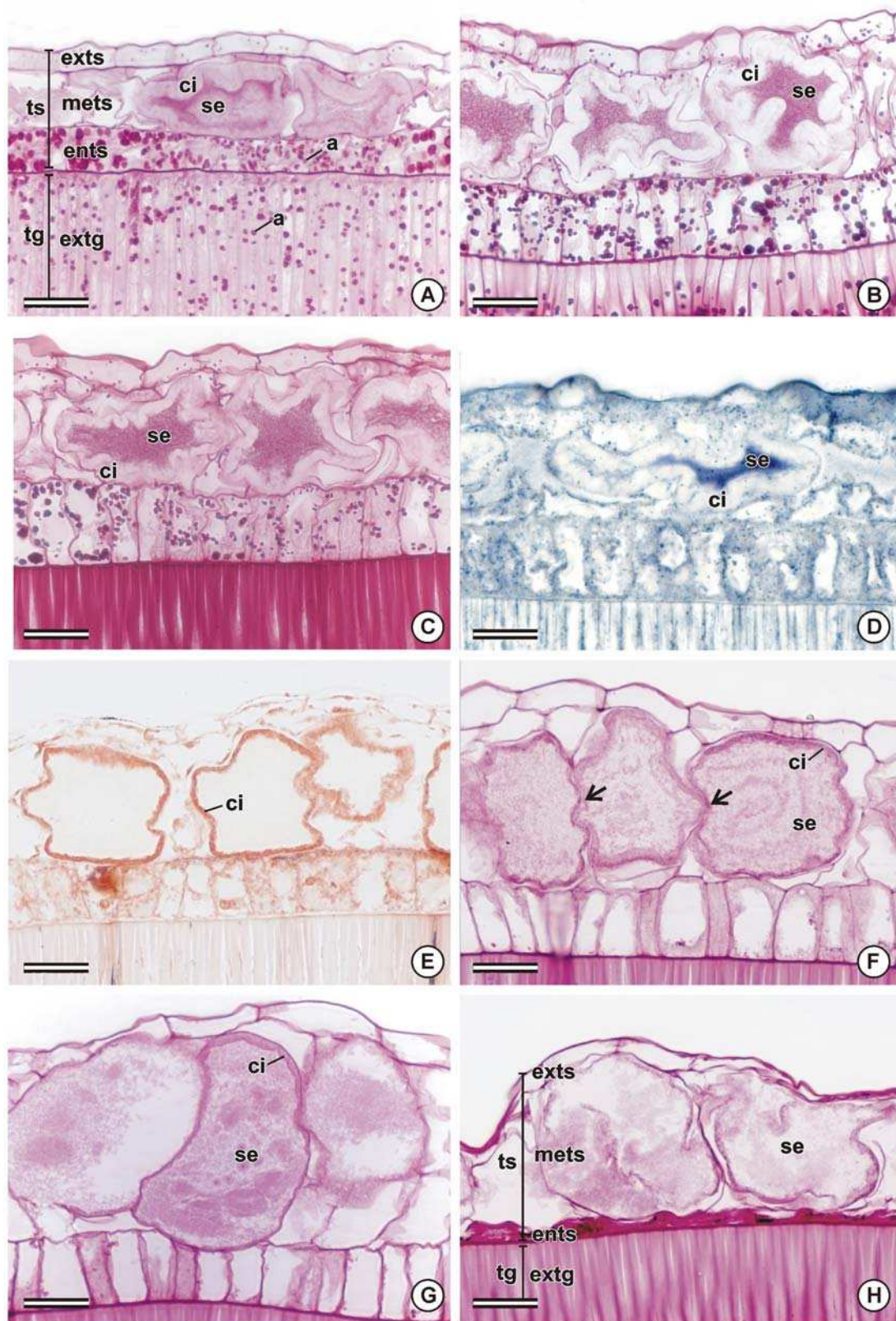


Figura 3. Desenvolvimento de glândulas de bixina em sementes de *Bixa orellana* aos 75 (A), 90 (B), 105 (C-E), 120 (F), 150 (G) e 180 (H) dias após a antese. Seções transversais (fotomicrografias). A-C, F-H, corado com PAS; coloração magenta indica polissacarídeos. Setas indicam região de coalescência entre glândulas adjacentes. D, corado com sudan black B; coloração azul escuro indica lipídios. E, corado com XP; coloração alaranjada indica proteínas. a, amido; ci, citoplasma; ents, endotesta; exts, exotesta; mets, mesotesta; se, secreção; tg, tegmen; ts, testa. Barra = 25 μ m (A-H).

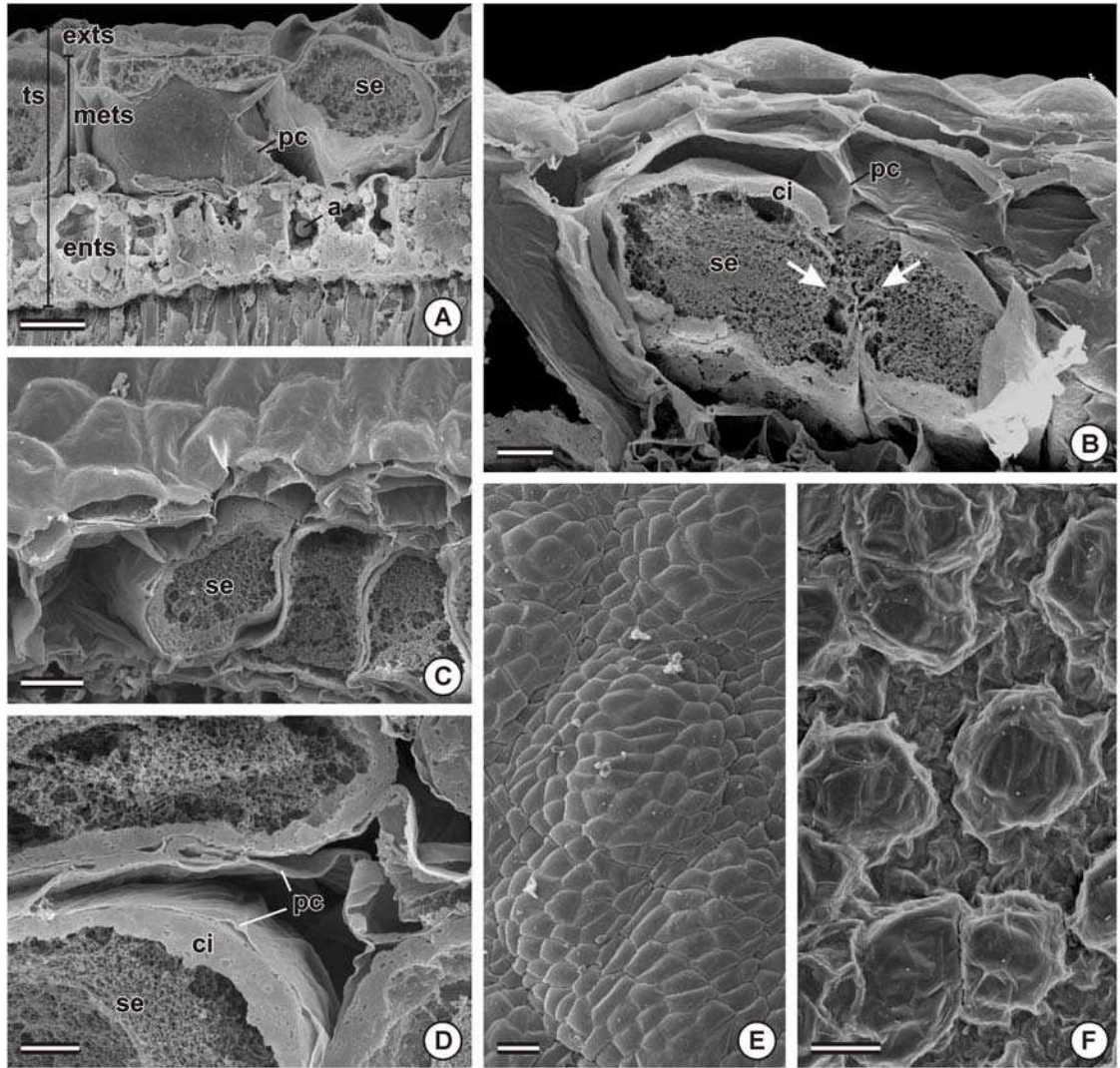


Figura 4. Desenvolvimento de glândulas de bixina em sementes de *Bixa orellana* aos 75 (A), 120 (B-D), 150 (E) e 180 (F) dias após a antese. Eletromicrografias de varredura. A-D, aspecto geral das glândulas em desenvolvimento. E-F, superfície da testa. Setas indicam região de coalescência entre glândulas adjacentes. a, amido; ci, citoplasma; ents, endotesta; exts, exotesta; mets, mesotesta; pc, parede celular; se, secreção; ts, testa. Barra = 20 μm (A, C), 10 μm (B), 5 μm (D), 50 μm (E-F).

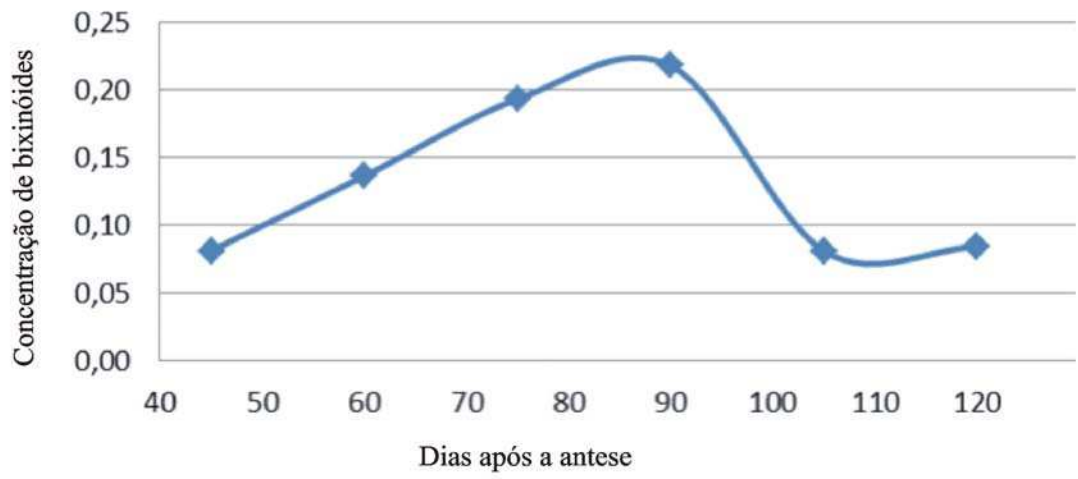


Figura 5. Concentração de bixinóides durante o desenvolvimento de sementes de *Bixa orellana*.

DISCUSSÃO

As estruturas secretoras são classificadas de acordo com a posição no órgão, a ontogenia, a estrutura, o tipo de material secretado e a função na planta (Fahn, 1979; Evert, 2006). As estruturas secretoras de bixina encontradas em *B. orellana* são relatadas na literatura como células secretoras (Metcalf e Chalk, 1950), células de bixina (Corner, 1976; Amaral et al., 2009), células de pigmento (Kaur, 1969; Corner, 1976) e idioblastos ramificados (Keating, 1970). No entanto, todas essas classificações são questionáveis.

Idioblastos secretores são estruturas unicelulares na origem e no desenvolvimento (Fahn, 1979, 1988; Evert, 2006), enquanto as estruturas secretoras de bixina são unicelulares na origem, mas pluricelulares no desenvolvimento, considerando a incorporação gradativa e contínua de células à estrutura em formação, que se torna um cenócito. Não ocorrem divisões celulares no desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina, e a incorporação de células ocorre de maneira incomum e gradativa. Há manutenção das paredes celulares externas e degradação das paredes que estabelecem contato entre células adjacentes envolvidas na formação da estrutura secretora, mas manutenção de vários núcleos, em um cenócito. Com o desenvolvimento, há a formação de uma faixa citoplasmática periférica única, com núcleos degradados, delimitando um espaço central que acumula a secreção. Portanto, as denominações de célula secretora, célula de bixina, célula de pigmento e idioblasto ramificado não se adequam à estrutura secretora de bixina.

As estruturas secretoras de bixina também não podem ser classificadas como cavidade ou canal secretor, mesmo que se assemelhem estruturalmente a estes. As cavidades e os canais apresentam epitélio secretor e liberam as substâncias produzidas em um espaço intercelular, que pode ser formado por processo lisígeno, esquizógeno ou esquizolisígeno (Fahn, 1979; Evert, 2006). Cavidades e canais podem se originar de uma única célula, mas só se tornam multicelulares devido às sucessivas divisões das células iniciais (Bosabalidis e Tsekos, 1982; Curtis e Lersten, 1994; Kalachanis e Psaras, 2005), e não pela coalescência gradativa de células, como nas estruturas secretoras de bixina.

O processo ontogenético das estruturas secretoras de bixina apresenta algumas semelhanças com a gênese de laticíferos articulados e não articulados, como uma fase cenocítica (laticíferos não articulados) e a dissolução de paredes entre células adjacentes (laticíferos articulados) (Fahn, 1979; Evert, 2006). O estudo mais pormenorizado do

desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina foi feito por Kaur (1969), que as descreve como cenócitos, onde uma única célula inicial sofreria cariocinese, torna-se multinucleada e se avolumaria pela expansão e acúmulo de secreção, como nos laticíferos não articulados. O que foi observado no presente trabalho é que não há citocinese ou cariocinese durante o desenvolvimento das estruturas secretoras de bixina, mas sim agregação de outras células e dissolução de paredes comuns. O processo ontogenético das estruturas secretoras de bixina se assemelha ao dos laticíferos articulados no que diz respeito à origem pluricelular, degradação de paredes entre células adjacentes e fusão de protoplastos, embora seja distinto pela coalescência sincronizada de células enfileiradas. Na gênese das estruturas secretoras de bixina, a coalescência de células não é sincronizada e ocorre de maneira centrífuga a partir da célula inicial. A origem meristemática é outra diferença marcante entre a gênese dos laticíferos e a gênese das estruturas secretoras de bixina: a partir do procâmbio ou do câmbio vascular na maioria dos laticíferos (Fahn, 1979; Evert, 2006) e a partir do meristema fundamental nas estruturas secretoras de bixina, tanto em órgãos vegetativos (Freitas, 2009) como nas sementes.

Outra particularidade das estruturas secretoras de bixina nas sementes é a manutenção da funcionalidade mesmo com a degradação dos núcleos durante o desenvolvimento. Este fato poderia estar associado à incorporação gradativa de novas células, ainda nucleadas, às estruturas secretoras de bixina.

A secreção das estruturas secretoras de bixina é composta por uma porção polissacarídica e por uma porção lipídica. A bixina, que é um apocarotenoide, está presente na porção lipídica. Outros carotenoides como xantofila, caroteno e licopeno são encontrados em plastídios especializados, os cromoplastos, distribuídos em células ordinárias de raízes, frutos, flores e sementes, provendo a pigmentação em tons de amarelo a vermelho (Cuttriss e Pogson, 2004). A ocorrência de estruturas secretoras de pigmentos é um caráter incomum, raramente encontrado em vegetais, como em *Hypericum perforatum* (Onelli et al., 2002; Maggi et al., 2004). No entanto, estruturas secretoras de bixina estão distribuídas em folhas, caules, raízes (Freitas, 2009) e estruturas reprodutoras, especialmente as sementes de *B. orellana*.

Estruturas secretoras de pigmentos também ocorrem em espécies de *Hypericum*, chamados de nódulos negros, e estão distribuídas em folhas, caules e estruturas reprodutoras (Maggi et al., 2004), mas não há um órgão ou região com acúmulo significativo de tais nódulos, como no tegumento das sementes de *B. orellana*. Nódulos negros de *H. perforatum* apresentam anatomia e ultraestrutura pouco usual (Onelli et al.,

2002) e secretam hipericina, uma naftodiantrona vermelha, utilizada como antidepressivo (Zobayed et al., 2006). Os nódulos formam-se a partir de uma estrutura multicelular globular, com aspecto de meristemoide, que se desenvolve pelo aumento do tamanho das células, sem lise celular; ocorre acúmulo de secreção em vacúolos espaços periplasmáticos (Onelli et al., 2002), diferindo drasticamente do processo ontogenético das estruturas secretoras de bixina. A secreção dos nódulos de *H. perforatum* é inicialmente vermelha, e torna-se enegrecida durante o desenvolvimento da estrutura secretora, mas não há plastídios envolvidos na síntese (Onelli et al., 2002), como é esperado no processo de síntese de carotenoides (Ben-Shaul & Naftali, 1969; Simpson et al., 1975).

Uma terminologia adequada para a estrutura secretora de bixina deve ser generalista e fugir de especificações, como glândula de bixina ou glândula de pigmento, pois tanto o processo ontogenético como o tipo de secreção são incomuns.

O teor de bixinoides nas sementes de *B. orellana* chegou ao valor máximo de 0,22 %, aos 90 d.a.a., mesmo antes da completa diferenciação das estruturas secretoras de bixina, e o decréscimo até os 105 d.a.a., o que pode estar relacionado ao aumento da massa da matéria seca nesse período pelo acúmulo de reservas. Aproximadamente 70% do teor de bixinoides das sementes podem ser atribuídos à bixina, que é o componente majoritário do corante (Silva et al., 2010).

De acordo com a literatura, os teores máximos de bixina podem variar de 4,36% a 6,26% (Kato et al., 1992; Barbosa-Filho et al., 1998; Pedrosa et al., 1999; Carvalho et al., 2010), e as variações podem estar associadas ao genótipo, estágio de desenvolvimento das sementes, condições edafoclimáticas durante o desenvolvimento das sementes (Falesi & Kato, 1992; Barbosa-Filho et al., 1998; Santana et al., 2008) e, até mesmo, aos métodos de extração e análise (Carvalho et al., 2010).

CONCLUSÕES

As estruturas secretoras de bixina ou glândulas de bixina nas sementes de *B. orellana* apresentam processo ontogenético e tipo de secreção (pigmento) incomuns. Porém, estudos ultraestruturais ainda são necessários para a confirmação do processo ontogenético e para o conhecimento dos processos de síntese, degradação e acúmulo de substâncias e componentes celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L.I.V.; Cortelazzo, A.L.; Buckeridge, M.S.; Pereira, L.A.R.; Pereira, M.F.D.A. 2009. Anatomical and biochemical changes in the composition of developing seed coats of annatto (*Bixa orellana* L.). *Trees* 23: 287-293.
- Barbosa-Filho, J.M.; Silva-Filho, R.N.; Lira, B.F.; Macedo, R.O; Silva, M.S.; Chaves, M.C.O.; Souza, M.F.V.; Cunha, E.V.L., Athayde-Filho, P.F. 1998. Teor de Bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 7/8(1/2): 41-47.
- Ben-Shaul, Y.; Naftal, Y. 1969. The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of *Lycopersicum esculentum*. *Protoplasma* 67: 333-344.
- Bosabalidis, A; Tsekos, I. 1982. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. *Protoplasma* 112: 55-62.
- Carvalho, P.R.N.; Silva, M.G.; Fabri, E.G.; Tavares, P.E.R.; Martins, A.L.M.; Spatti, L.R. 2010. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônômico (IAC). *Bragantia* 69(3): 519-524
- Corner, E. J. H. 1976. The seeds of Dicotyledons. Cambridge: Cambridge University Press. 2v.
- Curtis, J. D.; Lersten, N. R. 1994. Developmental anatomy of internal cavities of epidermal origin in leaves of *Polygonum* (Polygonaceae). *New Phytologist* 127: 761-770.
- Cuttriss, A.; Pogson, B. 2004. Carotenoids. In: Davies, K. M. (org.) *Plant Pigments and their Manipulation*. Oxford: Ed. Blackwell Publishing. 369p.
- David, R.; Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris, série D258*: 1338-1340.

- Di Stasi, L.C. & Hiruma-Lima, C.A. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. revista e ampliada. São Paulo: Editora UNESP, 604p.
- Evert, R. F. 2006. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3. ed. New Jersey: Wiley Interscience. 601p.
- Fahn, A. 1979. Secretory tissues in plants. London:Academic Press Inc.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist 108:229-257.
- Falesi, I.C.; Kato, O.R. 1992. A cultura do urucu no Norte de Brasil. Belém, EMBRAPA-CPATU (EMBRAPA-CPATU, Documentos, 65).
- Freitas, P. F. 2009. Anatomia foliar, ontogenia e histoquímica das estruturas secretoras em órgãos vegetativos de *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
- Furr, M.; Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44(2): 153-159.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- Kalachanis, D.; Psaras, G. K. 2005. Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. Biologia Plantarum 49(1): 105-110.
- Kato, O.R.; Figueirêdo, F.J.C.; Belfort, A.J.L.; Nogueira, O.L.; Barbosa, W.C. 1992. Época de colheita de sementes de urucu: emergência e teor de corantes. Pesquisa Agropecuária Brasileira 27(9): 1291-1302.
- Kaur, H. 1969. Embryological investigations on *Bixa orellana* L. Proceedings of the National Institute of Sciences of India 35: 487-506.
- Keating, R. C. 1970. Comparative morphology of the Cochlospermaceae. II. Anatomy of the young vegetative shoot. American Journal of Botany 57(8): 889-898.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. 1979. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

- Maggia, F.; Ferretti, G.; Pocceschi, N.; Menghini, L.; Ricciutelli, M. 2004. Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. *Fitoterapia* 75: 702-711.
- Maia, V. 1979. Técnica histológica. São Paulo: Atheneu.
- Metcalf, C. R.; Chalk, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press. 1500 p., v. 1.
- O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- Onelli, E.; Rivetta, A.; Giorgi, A.; Bignami, M.; Cocucci, M., Patrignani, G. 2002. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum*. *Flora* 197:92-102.
- Paiva, E.A.S.; Pinho, S.Z.; Oliveira, D.M.T. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.) Light microscopy: methods and protocols. New York, Springer/Humana Press. p. 37-49. (Methods in Molecular Biology, n. 689).
- Pearse, A.G.E. 1980. Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology. v.2, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, Longman Group Limited.
- Pedrosa, J.P.; Cirnei, L.E.M.R.; Neto, J.M.M. 1999. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 3(1): 121-123.
- Penna, D. D.; Pogson, B. J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711-738.
- Prance, G. T. 1976. Algumas flores da Amazônia. Manaus: INPA. 56p.
- Preston, H.D.; Rickard, M.D. 1980. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemical* 5: 47-56.

- Santana, K.C.; Guedes, P.A.; Rebouças, T.N.H.; São José, A.R. 2008. Teores de bixina em urucum (*Bixa orellana*) 'Piave Vermelha', em diferentes acondicionamentos e temperaturas. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 2(1): 19-22.
- Silva, P. I. 2007. Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 145 p.
- Simpson, D. J.; Baqar, M. R.; Lee, T. H. 1975. Ultrastructure and carotenoid composition of chromoplasts of the sepals of *Strelitzia reginae* during floral development. *Annals of Botany* 39: 175-83.
- Stringheta, P. C.; Silva, P. I.; Costa, M. G. C.; Soares, V. L. F.; Gesteira, A.G.; Cruz, A. C. F.; Otoni, W. C. 2008. Pigmentos do urucum – estrutura, química, biossíntese e degradação. p. 24-26. In: Stringheta, P. C.; Silva, P. I. (Org.). *Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema. 166p.
- Tirimanna, A.S.L. 1981. Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. seeds by thin layer chromatography. *Microchimica Acta* 76(1-2): 11-16.
- Vidal, B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22: 45-64.
- Zobayed, S. M. A.; Afreen, F.; Goto, E.; Kozai, T. 2006. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 98: 793–804.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes maduras podem ser consideradas sem dormência morfológica, uma vez que o embrião já está completamente desenvolvido e circundado pelo endosperma rico em reservas, mas com dormência imposta por características do tegumento, como esclerificação do exotégmen, acúmulo de compostos fenólicos em camadas do tégmen e tampão calazal. O endosperma acumula lipídio, amido e proteínas, enquanto o embrião acumula prioritariamente lipídios e proteínas.

As estruturas secretoras de bixina ou glândulas de bixina de sementes de *B. orellana* e apresentam processo ontogenético e tipo de secreção muito peculiares. Porém, estudos ultraestruturais ainda são necessários para a confirmação do processo ontogenético e para o conhecimento dos processos de síntese, degradação e acúmulo de substâncias e componentes celulares.