



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLÍOLOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.).**

**FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES**

**BELÉM - PARÁ**

**2010**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLÍOLOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.)**

**FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

**Co-orientador:** Dra. Fernanda Ilkiu Borges de Souza

**BELÉM - PARÁ**

**2010**

tese  
572.2  
M 027



Moraes, Fabrícia Kelly Cabral

Análise fisiológica e anatômica de folíolos em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)/Fabrícia Kelly Cabral Moraes.- Belém, 2010.

66f.:il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

1. *Fisiologia vegetal* 2. *Estádio foliolar* 2. *Trocãs gasosas* 3. *Pigmentos cloroplastídicos*; 4. *Anatomia foliar* 5. *Andiroba* I. *Título.*

CDD – 571.2



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLÍOLOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.)**

**FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Eng. Agrônomo, MSc., DSc., Prof. Hugo Alves Pinheiro  
Presidente/Orientador  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Eng. Agrônomo, MSc., DSc. Marco Antonio Menezes Neto  
1º Examinador  
Universidade Federal do Pará

---

Eng. Agrônomo, MSc., DSc., Prof. Reginaldo Alves Festucci Buselli  
2º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Biólogo, MSc., DSc. Roberto Cezar Lobo da Costa  
3º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia

**DEDICO**

**À minha mãe, Lúcia Cleide Moraes.**

**Às minhas irmãs Francianny, Fransuelen, Jaqueline e Rosicleide.**

**Aos meus amigos, tão importantes em todos os momentos da minha vida.**

**Aos demais familiares, pelo incentivo.**

**OFEREÇO**

**Ao meu Pai (grande homem e amigo) João Furtado Moraes, “*in memoriam*”, que sempre me incentivou a crescer, sonhar e lutar por meus objetivos. Obrigada, Pai – onde quer que estejas – por sua presença em minha vida e, principalmente, pelo amor, ensinamentos, carinho e respeito que dedicou a mim.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, de infinita misericórdia, por ter me dado força para completar mais essa etapa da minha vida e por colocar em meu caminho pessoas abençoadas;

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pela oportunidade de realização deste Curso;

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, pela oportunidade concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao corpo docente da Pós-graduação, pelos ensinamentos, contribuindo assim para minha formação profissional, não medindo esforços para atender e transmitir conhecimentos;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Hugo Alves Pinheiro, por todos os ensinamentos teóricos, metodológicos e éticos que recebi ao longo desses dois anos de convivência. Pela confiança depositada em mim e estímulo, no intuito de me fazer acertar e ser uma profissional melhor;

À Dra. Fernanda Ilkiu Borges de Souza, pela atenção dispensada, orientação e apoio na utilização do Laboratório de Anatomia, na Embrapa Amazônia Oriental;

Aos professores Dr. Marco Antonio Menezes Neto, Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli e Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa pela participação nesta banca;

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) por permitir o uso dos microscópios e câmara fotográfica, para obtenção das imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz;

À Profa. Cristina Maria Araujo Dib Taxi, coordenadora do Laboratório de Físico-química (CTA/ISAHR/UFRA), onde foram realizadas as análises deste trabalho;

À Profa. Rosa Santa Rosa e à Laboratorista Luciana Pinheiro, pela atenção e ensinamentos durante esta jornada;

A todos os funcionários com quem tive a oportunidade de trabalhar, em especial ao Sr. Demóstenes de Andrade Silva Filho (Doquinha), pelo apoio concedido e por nunca ter medido esforços para ajudar na casa de vegetação e nas atividades de campo. Obrigada pela amizade;

A todos os funcionários e estagiários do Laboratório de Anatomia da Embrapa Amazônia Oriental, em especial ao Edilson Freitas da Silva, com quem tive a oportunidade de trabalhar durante o período em que realizei as análises anatômicas;

Ao amigo Rivaldo Alves Nunes, pela amizade, companheirismo e aprendizagem no decorrer de minha formação acadêmica;

Ao Jessivaldo Galvão, pela amizade, esclarecimentos e ajuda durante a execução do experimento;

À secretária Gracy Monteiro (Curso de Pós-graduação em Agronomia - UFRA) pela atenção dispensada em todos os momentos solicitados;

Aos estagiários e amigos: Dalton Jr., Gledson Castro e Bruno Quadros, pelo trabalho e dedicação, sempre dispostos a me ajudar nas várias etapas desta dissertação;

Aos amigos Roberto Rosa, Marcelle Auday e Elizabeth Shimizu pela amizade, carinho, apoio e ensinamentos compartilhados em muitos momentos no decorrer deste Mestrado;

À amiga, irmã e companheira de labuta, Kaliene Carvalho, pela amizade, carinho e ajuda nos trabalhos de casa de vegetação e laboratório;

À amiga e irmã Hérica Oliveira, pelo carinho, amizade e por ter estado ao meu lado em momentos difíceis e por compartilhar das minhas aflições no decorrer deste Curso;

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação em Agronomia - UFRA, em especial aos amigos que aqui conquistei: Alessandra Moraes, Ângela Lobato, Augusto Pedroso, Bruno Brabo, Daniel Pinheiro, Elaine Santos, Érica Freires, Joseane Cardoso, Joseani Castro, Josemar Vasconcelos, Patrícia Maia e Sannah Birani pela convivência harmoniosa, incentivo, companheirismo e amizade durante o período de estudos;

Aos meus pais, merecedores de minha admiração e respeito; meu referencial de força, coragem, determinação, princípios e caráter. Jamais teria chegado até aqui sem o apoio, o incentivo, o amor e o exemplo de vida que vocês me deram;

Às minhas irmãs pelo amor, amizade, conselhos e pela força;

Aos demais familiares pelo incentivo;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a finalização desta pesquisa;

Enfim, a todos aqueles que, um dia, lerem e/ou consultarem esta dissertação.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

## SUMÁRIO

|  | p. |
|--|----|
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....  | 8  |
| LISTA DE TABELA E FIGURAS.....   | 9  |
| <br>   |    |
| CAPÍTULO I   |    |
| RESUMO GERAL.....  | 11 |
| GENERAL ABSTRACT.....  | 12 |
| INTRODUÇÃO GERAL.....  | 13 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 17 |
| <br>   |    |
| CAPÍTULO II  |    |
| RESUMO.....  | 20 |
| ABSTRACT.....  | 21 |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 22 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS  |    |
| 2.1. Material vegetal, condições de crescimento e identificação dos estádios<br>de desenvolvimento do folíolo..... | 24 |
| 2.2. Trocas gasosas.....   | 25 |
| 2.3. Pigmentos cloroplastídicos.....   | 25 |
| 2.4. Carboidratos solúveis totais, amido e sacarose.....   | 26 |
| 2.5. Análises estatísticas.....  | 27 |
| 3. RESULTADOS  |    |
| 3.1. Estádios de desenvolvimento dos folíolos.....   | 28 |
| 3.2. Pigmentos cloroplastídicos.....   | 28 |
| 3.3. Trocas gasosas.....   | 31 |
| 3.4. Concentrações de carboidratos solúveis totais, sacarose e amido.....  | 32 |
| 4. DISCUSSÃO.....  | 34 |
| 5. CONCLUSÕES.....   | 39 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO III   |    |
| RESUMO.....  | 43 |
| ABSTRACT.....  | 44 |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 45 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS  |    |
| 2.1. Material vegetal, identificação dos estádios de desenvolvimento dos<br>folíolos e amostragens.....        | 47 |
| 2.2. Obtenção de cortes histológicos.....  | 48 |
| 2.2.1. Dissociação de epiderme para visualização e determinação de<br>freqüência estomática e de tricomas..... | 48 |
| 2.2.2. Freqüência estomática e de tricomas.....  | 49 |
| 2.2.3. Obtenção de Fotomicrografias e Eletromicrografias.....  | 49 |
| 2.3. Montagem das lâminas para os testes microquímicos .....   | 50 |
| 2.4 Testes microquímicos.....  | 50 |
| 3. RESULTADOS  |    |
| 3.1. Epiderme .....  | 51 |
| 3.2. Mesofilo.....   | 55 |
| 3.3. Nervura central.....  | 56 |
| 3.4. Margem.....   | 56 |
| 3.5. Testes microquímicos.....   | 58 |
| 4. DISCUSSÃO.....  | 59 |
| 5. CONCLUSÃO.....  | 63 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 64 |

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

*ABS* = Absorvância

*A* = Taxa de assimilação líquida do carbono

$\text{CaCO}_3$  = Carbonato de cálcio

*CST* = Carboidratos solúveis totais

*E* = Transpiração

*Epad* = Epiderme adaxial

*Epab* = Epiderme abaxial

*Esc* = Esclerênquima

*F1* = Floema

$g_s$  = Condutância estomática

$\text{HClO}_4$  = Ácido perclórico

*MEV* = Microscopia eletrônica de varredura

*MPEG* = Museu Paraense Emílio Goeldi

$\text{NaClO}$  = Hipoclorito de sódio

*NADP* = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

*NADPH* = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

*NEFs* = Nectários extraflorais

*Pl* = Parênquima Lacunoso

*Pp* = Parênquima paliçádico

*Xl* = Xilema

## LISTA DE TABELA E FIGURAS

|  | p. |
|--|----|
| <b>CAPÍTULO II</b>   |    |
|  | 24 |
| <b>Figura 1.</b> Plantas de <i>C. guianensis</i> em casa de vegetação (ICA/UFRA).....  |    |
| <b>Figura 2.</b> Estádios de desenvolvimento foliolares de plantas de <i>C. guianensis</i> .....   | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Teores foliares de clorofila <i>a+b</i> (3A), clorofila <i>a</i> (3B) e carotenóides totais (3C) de folíolos de <i>C. guianensis</i> em função das porções do limbo e dos diferentes estádios de desenvolvimento (E0 a E6).....   | 29 |
| <b>Figura 4.</b> Concentrações médias de pigmentos cloroplastídicos (cl <i>a+b</i> , cl <i>a</i> e carotenóides totais) em folíolos de <i>C. guianensis</i> de diferentes estádios de desenvolvimento.....   | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Taxa de assimilação líquida do carbono ( <i>A</i> , 5A), condutância estomática ao vapor d'água ( <i>g<sub>s</sub></i> , 5B), transpiração ( <i>E</i> , 5C) e eficiência instantânea do uso de água ( <i>A/E</i> , 5D) em folíolos de <i>C. guianensis</i> de diferentes estádios de desenvolvimento (E2 a E7)..... | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Teores foliares de carboidratos solúveis totais (CST, 6A), sacarose (SAC, 6B) e amido (Amido, 6C) em folíolos de <i>C. guianensis</i> de diferentes estádios de desenvolvimento.....  | 33 |

## CAPÍTULO III

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Plantas jovens de andiroba. <b>A.</b> <i>Carapa guianensis</i> , <b>B.</b> Detalhe do folíolo de andiroba indicando as regiões utilizadas como amostras para análises anatômicas..... | 48 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 2.</b> Imagens paradérmicas de <i>C. guianensis</i> Aubl.....   | 52 |
| <b>Figura 3.</b> Cortes transversais e paradérmicos de folíolos de <i>C. guianensis</i> em estádios de desenvolvimento E1 e E6.....     | 53 |
| <b>Figura 4.</b> Posicionamento do estômato em relação às células epidérmicas em folíolo de <i>C. guianensis</i> em E6.....             | 53 |
| <b>Tabela 1.</b> Variação na densidade estomática e de tricomas durante o desenvolvimento de folíolos de <i>Carapa guianensis</i> ..... | 54 |
| <b>Figura 5.</b> Visualização de tricomas glandulares e tectores em folíolos de <i>Carapa guianensis</i> .....                          | 54 |
| <b>Figura 6.</b> Visualização de nectários extraflorais em folíolos de <i>C. guianensis</i> .....                                       | 55 |
| <b>Figura 7.</b> Imagens representativas da seção transversal do limbo foliolar de <i>C. guianensis</i> .....                           | 56 |
| <b>Figura 8.</b> Imagens representativas da nervura central em secção transversal do folíolo de <i>C. guianensis</i> .....              | 57 |
| <b>Figura 9.</b> Imagens representativas da margem em secção transversal do folíolo de <i>C. guianensis</i> .....                       | 57 |
| <b>Figura 10.</b> Visualização de drusas na nervura central em epiderme abaxial de folíolos de <i>C. guianensis</i> em estágio E6.....  | 58 |
| <b>Figura 11.</b> Visualização de grãos de amido folíolos de <i>C. guianensis</i> em estádios E1, E3 e E6.....                          | 58 |

## CAPÍTULO I

### RESUMO GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a síntese e distribuição de pigmentos cloroplastídicos, as trocas gasosas e produção de assimilados e caracterizar a anatomia de folíolos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) em diferentes estádios de desenvolvimento. Mudanças de andiroba de oito meses de idade foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 20 L, preenchidos com latossolo amarelo textura média. Durante todo o período experimental as plantas foram irrigadas diariamente. Foram determinados os diferentes estádios de desenvolvimento dos folíolos levando-se em conta a coloração do limbo. Foram identificados sete estádios foliolares diferentes (E0, E1, E2, E3, E4, E5 e E6), além do metáfilo. A taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*) foi negativa no estádio E1, justificada pelos teores reduzidos de clorofilas *a*. A partir do estádio E2, foi constatado um gradual aumento em *A*, tornando-se positiva e diretamente relacionada ao desenvolvimento dos folíolos. A condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) e a transpiração (*E*) e a eficiência no uso da água aumentaram em função do desenvolvimento dos folíolos, principalmente no E4 e E6. Os teores de sacarose e amido aumentaram com o desenvolvimento dos estádios dos folíolos, influenciados pelo aumento crescente da taxa fotossintética. Não houve uma relação direta entre carboidratos solúveis totais e *A*. As trocas gasosas, pigmentos foliares e concentrações de amido e sacarose foram maiores com o desenvolvimento do folíolo, em especial a partir do estádio E4. Para as avaliações anatômicas, foi observado que, nos diferentes estádios de desenvolvimento do folíolo de *C. guianensis*, estruturas anatômicas como a camada de cera epicuticular, epiderme, parênquimas, estômatos, nectários extraflorais e cristais são qualitativamente comuns a todos os estádios de desenvolvimento. No entanto, um maior acúmulo de amido foi visualmente constatado em folíolos mais maduros e a frequência estomática foi maior na epiderme abaxial nos estádios E4, E5 e E6, enquanto os tricomas foram mais frequentes na epiderme adaxial em E1 a E3.

**Palavras chave:** Estádio foliolar; Trocas gasosas; Pigmentos cloroplastídicos; Anatomia foliar; Andiroba.

### GENERAL ABSTRACT

This research aimed to evaluate leaflet concentration of chloroplastic pigments and changes in gas exchange, carbohydrates accumulation and anatomical characteristics as a function of leaflet development in young andiroba plants (*Carapa guianensis* Aubl.). Andiroba seedlings were cultivated under greenhouse conditions, under continuous irrigation, in 20 L pots filled with flat loam latosol. The experiment evaluation has started by the identification of leaflet developmental stages (LDS), visually performed according leaflet coloring. Six different LDS (E1, E2, E3, E4, E5 and E6) were identified. Net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ) was negative in E1, reaching positive values from E2 to E6. At least in parts, negative  $A$  in E1 may be explained by the lower chlorophyll  $a$  concentration. Nevertheless,  $A$  significantly increased from E2 to E6, concomitantly to increases in both Chl  $a+b$  and Chl  $a$ . Stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), and  $A/E$  reached higher averages from E4 to E6. Leaflet sucrose and starch increased according LDS at least in parts in response to increased  $A$ . Anatomical assessments suggest no significant differences in leaflet tissues and structures according LDS. Both epidermal waxes, parenchyma cells, extrafloral nectaries, and stomata structure did not vary with LDS. Higher accumulation of starch and higher frequency of stomata in abaxial epidermis was registered in mature leaflets. Nevertheless, higher frequency of trichomes was observed in youngest leaflets.

**Keywords:** Gas exchange, Chloroplastics pigments, Leaflet development, leaflet anatomy, andiroba.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Meliaceae possui cerca de 51 gêneros e aproximadamente 550 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais da América, África e Ásia, estendendo-se pela Nova Zelândia e ao longo da costa oriental da Austrália (PENNINGTON et al., 1981).

Na classificação taxonômica mais recente da família Meliaceae (PENNINGTON et al., apud LEITE, 1997), o gênero *Carapa* é composto de duas espécies: *Carapa guianensis* (Aubl.) e *Carapa procera* (DeCandolle). As diferenças entre *C. guianensis* e *C. procera* residem principalmente na forma das folhas e ramificações das inflorescências, características que confundem a identificação quando se trata de material herborizado (CARIOCA, 2002; FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Na Amazônia, *C. guianensis* é popularmente conhecida por andiroba, andirobinha, andiroba branca, andiroba-do-igapó, carape, jandiroba, penaiba (Brasil), roba-mahogany (Estados Unidos); karapa, british-guiana-mahogany (Guiana), bois-caille, carape-blanc, carape-rouge, andiroba-carapa (Guiana Francesa), crabwood (Inglaterra); cedro-bateo (Panamá); andiroba (Paraguai e Peru) e krappa (Suriname) (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). A denominação “andiroba” provém do nome indígena “Iandi”, que significa óleo, e “Rob” que significa amargo (ENRÍQUEZ, 2003).

No caso específico de *C. guianensis*, indivíduos desta espécie tem sido encontrados amplamente distribuídos nos Neotrópicos e na África Tropical, bem como no sul da América Central, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Brasil (NEVES et al., 2004). No Brasil, é predominantemente encontrada na bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas ao leito de rios e faixas alagáveis ao longo dos cursos d'água (SHANLEY; CYMERYYS; GALVÃO, 1998). Alguns indivíduos ocorrem em áreas de terra firme (NEVES et al., 2004).

*C. guianensis* é uma das árvores multiuso mais importantes da região Amazônica. Quando adultas apresentam de 25 a 35 m de altura, podendo alguns indivíduos chegar a cerca de 55 m de altura. Apresentam painel madeireiro de excelente qualidade, muito semelhante ao mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King.) (COSTA; SALLA; MARENCO, 2007).

A andirobeira produz sementes durante 20 a 30 anos e sua produção chega, em média, a 120 kg de amêndoas/árvore/ano (PORTAL DO EXTRATIVISMO, 2010). A extração do óleo de andiroba ocorre predominantemente no extremo norte do país, onde cerca de 20% do total é oriunda dos Estados do Amazonas e Pará (SILVA; NISHIOKA, 2007).

Segundo Boufleuer (2004) o óleo extraído das sementes tem coloração amarela, sabor amargo e alta densidade e é composto, dentre outros, por consideráveis concentrações de oleína, palmitina e glicerina, esta última em menor proporção em relação às duas anteriores. Estes compostos têm sido apontados como responsáveis pela ação farmacológica da espécie.

O óleo de andiroba atua na pele, regenerando e estimulando o tecido epitelial, e apresenta ótimo efeito, também sobre os tecidos inflamados. Funciona como febrífugo, vermífugo, purgativo, vesicante, cicatrizante, emoliente, anti-séptico, hidratante e suavizante (LEITE, 1997; FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). Como fitocosmético é usado na formulação de cremes e hidratantes, xampus, condicionadores, loções e géis, o que permite avaliar a importância econômico-social desta espécie (BOUFLEUER, 2004).

Existe um crescente interesse na extração e processamento do óleo de andiroba e beneficiamento de seus derivados (ácidos graxos, esteróis, pigmentos carotenóides, antioxidantes), uma vez que são matérias primas de extrema importância para a indústria farmacêutica, cosmética, de lubrificantes e tintas, dentre outras (CUNHA, 2002; SHANLEY, 2005). Ressalta-se que as fontes vegetais superaram em abundância as outras fontes naturais de materiais graxos, fornecendo, anualmente, em torno de 75% dos óleos e gorduras consumidos mundialmente (VILLARREYES apud FARIAS; COSTA, 1998).

Pelo método de extração tradicional (cozimento, decomposição e prensagem da amêndoa em tipitis), são necessários aproximadamente 6,25 kg de nozes para produzir 1 kg de óleo de andiroba; entretanto, não há um consenso sobre o rendimento da produção do óleo artesanal. Salgado (2000) afirma que 30 kg de sementes produzem 1 litro de óleo; enquanto Shanley (2005) aponta uma relação de 7 kg de amêndoas por litro de óleo.

A indústria “Amazon Oil”, em Ananindeua – PA, atua no segmento de extração de óleos de sementes amazônicas e compra por R\$ 250,00 a R\$ 300,00 a tonelada de matéria prima (amêndoas), dependendo da distância e qualidade do produto. Após o beneficiamento, a mesma comercializa o óleo a R\$ 24,00/kg (AMAZON OIL, comunicação pessoal, 02/2010).

As árvores de *C. guianensis* frutificam apenas em um período do ano. Dada a escassez de plantios comerciais de andiroba, a exploração de sementes para fins de produção de óleo tem sido realizada quase que exclusivamente de forma extrativista (BALZON et al., 2004). Esta prática tem sido cada vez mais intensificada, não garantindo ao mercado uma oferta em quantidade e qualidade do produto, limitando a geração de renda para o produtor.

Percebe-se, dessa forma, a necessidade de desenvolvimento de tecnologias que permitam a domesticação da espécie e, com isso, promover um estímulo ao desenvolvimento de plantios comerciais da mesma (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

A andiroba tem sido alvo de pesquisas por parte de institutos nacionais e internacionais interessados em suas possibilidades comerciais (MAY, 2002), visando gerar informações que corroborem para o estabelecimento de cultivos comerciais e permitam aperfeiçoar a extração de óleos.

Uma vez que a espécie não foi ainda domesticada, materiais genéticos (acessos) que reúnam características silviculturais desejáveis não estão disponíveis no mercado. Para a obtenção de materiais promissores é importante levar em conta os aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfoanatômicos da planta como um todo durante seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Estes permitirão entender como a planta responde aos diferentes habitats, condições climáticas (períodos chuvoso e seco), técnicas de manejo etc.

Do ponto de vista fisiológico, as folhas, em especial, são órgãos de extrema importância às plantas, por serem responsáveis pela captação de luz e fixação de CO<sub>2</sub> atmosférico e subsequente produção de assimilados (via fotossíntese). Além disso, por meio da transpiração, regulam a temperatura foliar e mantêm a planta em equilíbrio com o ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Em conjunto, as trocas gasosas estão relacionadas ao crescimento vegetativo e reprodutivo das plantas.

*C. guianensis* é uma espécie perenifólia, sendo que o tempo de vida da folha pode variar de sete a quatorze meses (MAGALHÃES; BLUM, 1999). As folhas de andiroba são compostas, paripinadas, com um pequeno apêndice na terminação da ráquis e, em média, apresentam de 30 a 90 cm de comprimento. Os folíolos são opostos, de 3 a 10 pares em média, e seu formato varia de elíptico a oblongo (FERRAZ et al., 2003; EMBRAPA, 2004).

Acompanhando o crescimento de mudas de andiroba em casa de vegetação, observa-se diferentes estádios de desenvolvimento dos folíolos, caracterizados visualmente pelas transições na coloração do limbo foliolar, que variam de marrom claro a verde intenso. Como bem estabelecido para outras espécies, é possível haver diferenças significativas nos processos fisiológicos (fotossíntese, condutância estomática e transpiração) e na produção de assimilados em função dos estádios de desenvolvimento dos folíolos. Em alguns casos, as alterações fisiológicas podem ser fruto das alterações anatômicas ocorrentes durante o desenvolvimento foliar.

Por exemplo, o comportamento fotossintético e a concentração de clorofilas aumentaram durante o desenvolvimento das folhas de *Hevea brasiliensis* (Wild. ex. Adr. de Juss.) (BERGONCI, 1981; MIGUEL et al., 2007). A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) foi negativa nas folhas jovens em razão dos reduzidos teores de clorofilas, da menor condutância estomática e baixa eficiência dos fotossistemas. Com o passar do tempo (estádios pré-estabelecidos), a *A* tornou-se positiva e gradativamente maior, estimulada por aumentos nos teores de clorofilas, eficiência fotoquímica do fotossistema II, eficiência de carboxilação, condutância estomática, transpiração e eficiência no uso da água (MIGUEL et al., 2007).

Watanabe, Yamaguchi e Nishimura (1995), investigando as mudanças anatômicas e fotossintéticas durante o desenvolvimento de folhas de manga (*Mangifera indica* L.cv. Irwin), constataram que as folhas novas continham elevados teores de antocianinas e que com o desenvolvimento da folha estes teores diminuíram concomitantemente com o aumento dos teores de clorofilas.

Para andiroba, não há estudos de caracterização do desenvolvimento de folíolos, nem em termos fisiológicos e bioquímicos, nem em termos anatômicos. Portanto, esta pesquisa teve o objetivo de analisar o teor e a distribuição de pigmentos cloroplastídicos, trocas gasosas, produção de assimilados e alterações anatômicas em folíolos de *C. guianensis* em diferentes estádios de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUFLEUER, N. T. **Aspectos ecológicos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., *Meliaceae*), como subsídios ao manejo e conservação.** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo dos Recursos Naturais)- Universidade Federal do Acre. Rio Branco. 84f. 2004.

CARIOCA, C. R. F. **Estudos de Processos de Hidrólise para o Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) em Sistemas Descontínuos.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2002.

CIÊNCIA E MEIO AMBIENTE. Universidade do Amazonas Investe no Óleo de Andiroba, 17 de maio, 2000. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/ciência/aplicada/2000/mai/17/140.htm>>. Acesso em: data de acesso.

COSTA, G. F; SALLA, L; MARENCO, R. A. Trocas gasosas e potencial hídrico em *Carapa guianensis* Aubl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, jul. 2007. p. 156-158,

CUNHA, M. A. E. **Estudo do Processo de Extração Supercrítica do resíduo sólido da semente de Andiroba.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2002.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Espécies arbóreas da Amazônia. Ficha n. 2: andiroba, *Carapa guianensis*.** Embrapa – CPATU. Belém, Brasil. 180p. 2004.

ENRÍQUEZ, G.; SILVA, M. A.; CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia: Usos e Potencialidades dos mais Importantes Produtos Naturais do Pará.** Belém: UFPA, Núcleo de Meio Ambiente, 2003

FARIA, L. J. G.; Costa, C. M. L.; SADALA, M. A. C.; MORRON-VILLAREYES, J. A.; Variação das Características Físico-químicas do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) Durante o Processo de Secagem, Natal ABQ, 1997 (37º Congresso Brasileiro de Química – Resumos).

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazonica**, v.32, p.647-661, 2002.

HAMMER, M.L.A. & JOHNS, E.A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Islands, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology** v. 40, p. 53-75. 1993.

LEITE, A. M. C. **Ecologia da Carapa guianensis Aublet (Meliaceae)**. Tese (Doutorado em Biologia Ambiental). C.C.B., UFPa, Belém, 1997.

MAGALHÃES, L. M. S.; BLUM, W. E. H. Concentração e distribuição de nutrientes nas folhas de espécies florestais, na Amazônia ocidental. **Floresta e Ambiente**. v. 6, n. 1, p. 127-137, jan./dez. 1999

MAY, P. Estado actual de La informacion sobre productos forestales no madereros. 114-211p. in FAO. Estado de La informacion forestal em Brasil. Santiago, Chile. 226 p. 2002.

McCORMICK, R.; ALLEMAN, T. L. Emissões de exaustão. In: **Manual do Biodiesel** (Knothe, G.; Van Gerpen, J.; Krahl, J.; Ramos, L. P. eds.). Editora Edgard Blücher, São Paulo, p.181-193, 2006.

NEVES, O. S. C.; BENEDIO, D. S.; MACHADO, R. V.; CARVALHO, J. G. Crescimento, produção de matéria seca e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S na parte aérea de mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) cultivadas em solo de várzea, em função de diferentes doses de fósforo. **Revista Árvore**, v. 28, n. 3, p. 343-349, 2004.

PENNINGTON, T. D.; STULES, B. T.; TAYLOR, D. A. H.. Meliaceae. **Flora Neotrópica** 28: 406-419, 1981

PORTAL DO EXTRATIVISMO. Essências florestais – Andiroba, 31 de janeiro, 2010. Disponível em: [http://www.florestavivaextrativismo.org.br/src\\_externo/essencia\\_andiroba.php?dest=essencia\\_andiroba](http://www.florestavivaextrativismo.org.br/src_externo/essencia_andiroba.php?dest=essencia_andiroba).

SALGADO, A. P. S. P. Extração de óleos essenciais. Minas Gerais, Vol. 1, 2000.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém, 127p. 1998.

SILVA, E. S.; NISHIOKA, T. D. **Extração e caracterização físico-química do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) por prensa, solvente e método artesanal**. Belém- Universidade Federal do Pará, Belém, 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química)

WATANABE, N. N.; YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M. Changes of anatomical features, photosynthesis and ribulose biphosphste carboxylase-oxygenase content of mango leaves. **Annals of Botany**, v.76: p. 649-656, 1995.

## CAPÍTULO II

### VARIAÇÕES NO TEOR E DISTRIBUIÇÃO DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS, NAS TROCAS GASOSAS E NA PRODUÇÃO DE ASSIMILADOS EM FOLÍOLOS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

#### RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a síntese e distribuição de pigmentos cloroplastídicos, as trocas gasosas e produção de assimilados de folíolos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) em diferentes estádios de desenvolvimento. Mudanças de andiroba de oito meses de idade foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 20 L, preenchidos com latossolo amarelo textura média. Durante todo o período experimental as plantas foram irrigadas diariamente. Foram determinados os diferentes estádios de desenvolvimento dos folíolos levando-se em conta a coloração do limbo. Foram identificados sete estádios foliolares diferentes (E0, E1, E2, E3, E4, E5 e E6), além do metáfilo. A taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*) foi negativa no estágio E1, justificada pelos teores reduzidos de clorofilas *a*. A partir do estágio E2, foi constatado um gradual aumento em *A*, tornando-se positiva e diretamente relacionada ao desenvolvimento dos folíolos. A condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) e a transpiração (*E*) e a eficiência no uso da água aumentaram em função do desenvolvimento dos folíolos, principalmente no E4 e E6. Os teores de sacarose e amido aumentaram com o desenvolvimento dos estádios dos folíolos, influenciados pelo aumento crescente da taxa fotossintética. Não houve uma relação direta entre carboidratos solúveis totais e *A*. As trocas gasosas, pigmentos foliares e concentrações de amido e sacarose foram maiores com o desenvolvimento do folíolo, em especial a partir do estágio E4.

**Palavras chave:** Clorofilas, Carotenóides, Desenvolvimento foliar, Fotoassimilados, Trocas gasosas.

### ABSTRACT

This research aimed to evaluate leaflet concentration of chloroplastic pigments and changes in gas exchange, and carbohydrates accumulation as a function of leaflet development in young andiroba plants (*Carapa guianensis* Aubl.). Andiroba seedlings were cultivated under greenhouse conditions, under continuous irrigation, in 20 L pots filled with flat loam latosol. The experiment evaluation has started by the identification of leaflet developmental stages (LDS), visually performed according leaflet coloring. Six different LDS (E1, E2, E3, E4, E5 and E6) were identified. Net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ) was negative in E1, reaching positive values from E2 to E6. At least in parts, negative  $A$  in E1 may be explained by the lower chlorophyll  $a$  concentration. Nevertheless,  $A$  significantly increased from E2 to E6, concomitantly to increases in both Chl  $a+b$  and Chl  $a$ . Stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), and  $A/E$  reached higher averages from E4 to E6. Leaflet sucrose and starch increased according LDS at least in parts in response to increased  $A$ .

**Keywords:** Gas exchange, Carotenoids, Chlorophylls, Leaflet development, Photoassimilates.

## 1. INTRODUÇÃO

As folhas são os órgãos responsáveis pela fotossíntese, devido à sua riqueza em clorofilas, sua posição na planta geralmente exposta à luz e sua forma laminar que permite o aproveitamento eficiente da energia luminosa (KERBAUY, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). São de grande importância, visto que através dos estômatos ocorrem as trocas gasosas, os quais permitem o influxo de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese e a perda de vapor de água via transpiração (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009; KRAMER E BOYER, 1995).

As folhas individuais apresentam grande variação fotossintética determinada por vários fatores, tais como a quantidade de radiação solar incidente, temperatura, suprimento de água e estágio de desenvolvimento (BRAGA et al., 2006). Tanto em plantas perenes como em plantas de ciclo curto, a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) aumenta em função da idade fisiológica das folhas, variando grandemente com a idade da folha e/ou folíolo (MARENCO; LOPES, 2005), ou seja, *A* aumenta de folhas juvenis para as folhas adultas e aumenta em folhas adultas de diferentes idades. Com a senescência, a *A* declina, pelo menos em partes, em resposta às reduções na sua concentração de clorofilas (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997).

De fato, a taxa fotossintética normalmente é menor em folhas em idade juvenil, tendendo a crescer progressivamente até que as folhas tornem-se completamente expandidas (maduras), quando a *A* apresenta uma fase de estabilização. Finalmente, a *A* diminui gradualmente à medida que as folhas entram em senescência (BONDADA; OOSTERHIUS, 1998). A diminuição do padrão fotossintético de uma folha senescente varia de espécie para espécie e pelas diferentes longevidades da folha. A diminuição gradual da *A* após a expansão completa da folha está relacionada ao decréscimo de clorofilas, da condutância estomática, dentre outros (BONDADA; OOSTERHIUS, 1998).

Modificações nas taxas fotossintéticas relacionadas à idade de desenvolvimento da folha estão também associadas às várias alterações anatômicas e fisiológicas que ocorrem durante a expansão foliar, tais como: o desenvolvimento de tecidos foliares internos, frequência de estômatos e tricomas, síntese de clorofilas, aumento da condutância estomática, capacidade de transporte de elétrons, síntese de proteínas e atividade da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxidase (Rubisco EC 4.1.1.39) além da

diminuição na respiração mitocondrial (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997).

Durante o desenvolvimento foliar de plantas lenhosas, as folhas jovens podem assumir várias colorações, tais como branco, vermelha ou normalmente verde muito claro e, tipicamente apresentam quantidades muito reduzidas de clorofilas e Rubisco. Portanto, a capacidade fotossintética é bem menor quando comparada às folhas normalmente de coloração verde escura (típica de folhas maduras) (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997).

Dos fatores intrínsecos que influenciam a fotossíntese, positiva ou negativamente, destacam-se a síntese e acúmulo dos pigmentos cloroplastídicos, em especial das clorofilas *a*, e a síntese das enzimas relacionadas à fixação do carbono, com destaque para a Rubisco (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dentre estes componentes que atuam na formação do aparato fotossintético, a clorofila é de fundamental importância para a captação e transferência de energia luminosa por serem constituintes dos fotossistemas; e, o segundo (Rubisco) responsável pela fixação do CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin, este último comum às plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e CAM (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os folíolos de *Carapa guianensis* (Aubl.) podem apresentar, empiricamente, diferentes estádios de desenvolvimento, visualmente diferenciados pela expansão e coloração do limbo e de alterações na sua espessura, uma vez que os folíolos mais velhos apresentam coloração verde intensa e aspecto coriáceo.

Do exposto, espera-se que folíolos de andiroba de diferentes estádios de desenvolvimento apresentem diferenças significantes em seus processos fisiológicos e bioquímicos, principalmente quanto ao teor e distribuição de pigmentos cloroplastídicos, trocas gasosas e produção de assimilados. Em *C. guianensis* essas possíveis diferenças não foram ainda mensuradas. Para avaliar esta hipótese, o comportamento fisiológico e bioquímico de folíolos de *C. guianensis* de diferentes estádios de desenvolvimento foi avaliado por meio da determinação das variações nos teores foliolares de clorofilas *a*, clorofila *a + b* e carotenóides totais; nas trocas gasosas (*A*; condutância estomática, *g<sub>s</sub>*; e transpiração, *E*); e nos teores foliolares de carboidratos solúveis totais, sacarose e amido.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal, condições de crescimento e identificação dos estádios de desenvolvimento do folíolo

Sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) foram coletadas de matrizes no campus da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém-PA (01°28'03"S, 48°29'18"W) no mês de fevereiro de 2009. As sementes foram embebidas em água por 24 h e semeadas em sacos de polietileno de 15 cm de diâmetro por 27 cm de altura para a uniformização das mudas. Após 60 dias do semeio, as mudas foram transplantadas para vasos de 20 L (uma muda por vaso), preenchidos com um latossolo amarelo textura média, previamente peneirado (malha de 4") para a retirada de impurezas.

Para a correção da acidez do substrato foi aplicado 2,7 g de calcário dolomítico por vaso e para a fertilização nitrogenada foi utilizado 1,65 g de uréia por vaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFRA, onde durante todo o período experimental as plantas foram irrigadas diariamente com a finalidade de repor a água perdida por evapotranspiração. Este procedimento foi realizado com base na pesagem dos vasos e reposição do volume de água evapotranspirada. O controle das ervas daninhas foi realizado manualmente.

Quando as plantas apresentaram cerca de oito meses de idade (Figura 1), os estádios de desenvolvimento do folíolo foram identificados visualmente com base na coloração do limbo, uma vez que o comprimento deste e sua largura, testados em experimento preliminar, não foram variáveis adequadas devido a variabilidade no formato do limbo foliolar. As demais avaliações foram realizadas a partir da identificação dos estádios de desenvolvimento dos folíolos.



Figura 1. Plantas de *C. guianensis* com oito meses de idade em casa de vegetação (ICA/UFRA).

## 2.2. Trocas gasosas

As determinações da taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) foram realizadas por meio de um analisador de gases a infravermelho (LCpro, ADC Bioscientific Ltd., UK) sob condições naturais de CO<sub>2</sub> e radiação fotossinteticamente ativa fixa de 1.000  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Esta radiação representa àquela comumente registrada para o horário das medições (8:00 - 10:00 h) e local do experimento. Como amostras, dois folíolos de cada estágio de desenvolvimento por planta foram selecionados do segundo par de folhas contado a partir do ápice. Um total de oito plantas (repetições) jovens de *C. guianensis* foram analisados.

## 2.3. Pigmentos cloroplastídicos

A coleta de amostras para análise de pigmentos foi realizada imediatamente após as medições de trocas gasosas. Os folíolos selecionados foram destacados e seccionados em três porções: apical, A; mediana, M; e basal, B. As amostras referentes a cada seção foram imediatamente armazenadas em envelopes de papel alumínio e congeladas para posterior análise. Foram determinadas as concentrações de clorofilas  $a$ ,  $a + b$  e carotenóides totais segundo a metodologia descrita por Lichthenthaler (1987).

Cada amostra (0,1 g de matéria fresca) foi macerada em 9 mL de acetona 80%, em presença de 0,1 g de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), e o homogenato resultante foi centrifugado a 4000 x  $g$ , por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a extração repetida duas vezes. Todos os sobrenadantes foram combinados e o volume final do extrato resultante ajustado para 25 mL pela adição de acetona 80%. Todas essas etapas foram realizadas sob banho de gelo e na completa ausência de luz. As absorvâncias ( $ABS$ ) das amostras foram registradas em espectrofotômetro a 470, 646,8 e 663,2 nm e os teores de clorofilas e carotenóides ( $\text{g pigmento kg}^{-1}$  matéria seca) foram obtidos de acordo com as equações abaixo:

$$1) \text{ Clorofila } a \text{ (Cl } a) = 12,25 \text{ } ABS_{663,2} - 2,79 \text{ } ABS_{646,8}$$

$$2) \text{ Clorofila } a+b = 7,15 \text{ } ABS_{663,2} + 18,71 \text{ } ABS_{646,8}$$

$$3) \text{ Carotenóides totais} = (1000 \text{ } ABS_{470} - 1,82 \text{ clorofila } a - 85,02 \text{ clorofila } b)/198$$

#### 2.4. Carboidratos solúveis totais, amido e sacarose

Amostras para a determinação dos teores foliares de carboidratos solúveis totais, amido e sacarose foram coletadas apenas da porção mediana de folíolos do segundo par de folhas a partir do ápice. Os folíolos foram destacados da folha imediatamente após as medições das trocas gasosas. As amostras foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e imediatamente secas (60°C) até massa constante utilizando-se uma estufa de ventilação forçada. Após trituração a pó fino, as mesmas foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados e encerradas em dessecador até o momento das análises.

Para extração e quantificação de carboidratos solúveis totais (CST) foi utilizada a metodologia de Dubois et al. (1956), com algumas alterações. Amostras de 0,05 g de matéria seca (MS) foram homogeneizadas em 5 mL de etanol 80% (em ebulição) e incubadas a 90°C por 60 min. Após centrifugação a 4.000 x g, por 10 min, à temperatura ambiente, o sobrenadante foi reservado e a extração repetida por duas vezes. Todos os sobrenadantes foram reunidos e, após determinar seu volume final, uma alíquota de 100 µL por amostra foi coletada. A cada alíquota foram adicionados 900 µL de água destilada e 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A mistura foi agitada e incubada a 100°C, por 15 min. Após o resfriamento, a *ABS* das amostras foi obtida a 620 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível (Genesys<sup>TM</sup> 10series, Thermo Electron Co., Madison, WI, USA). Para os cálculos, uma curva padrão de glicose foi preparada e os resultados expressos em mg de glicose g<sup>-1</sup> de MS.

O amido foi extraído dos resíduos da extração de CST, pela adição de 2 mL de água destilada e 3 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 52%. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 30 min. Após centrifugação (3.500 x g, por 5 min, à temperatura ambiente), o sobrenadante foi coletado e a extração repetida duas vezes. Todos os sobrenadantes foram reunidos e o volume final determinado. Foram então tomadas alíquotas de 100 µL de cada extrato as quais foram adicionados 900 µL de água destilada e 5 mL de antrona 0,2% (em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). Após agitação, incubação a 100°C (por 15 min) e resfriamento, a *ABS* das amostras foi obtida a 620 nm. Uma curva padrão de glicose foi preparada e os resultados calculados foram expressos em mg de glicose g<sup>-1</sup> de MS.

Os teores de sacarose foram determinados segundo Van Handel (1968), modificado. Amostras de 0,05 g MS foram homogeneizadas em 2,5 mL de MCW (metanol, clorofórmio e água; 12:5:3 v/v/v) por meio de agitador tipo vórtex. Após

centrifugação a 3.500 x g, por 15 min, à temperatura ambiente. A extração foi repetida duas vezes para o resíduo, os sobrenadantes reunidos e seu volume final determinado. A cada 2 mL deste sobrenadante foram adicionados 500 µL de clorofórmio e 750 µL de água destilada. Após vigorosa agitação e centrifugação da mistura (2.000 x g, por 10 min), a fração aquosa metanólica (superior) foi coletada e incubada a 35°C, por 40 min, para a evaporação do clorofórmio residual. Do extrato resultante, uma alíquota de 100 µL foi utilizada nas análises, iniciadas pela adição de 100 µL de KOH 30% e incubação a 100°C, por 10 min. Após resfriamento, 3 mL de antrona 0,2% (em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) foram adicionados e as amostras incubadas a 40°C, por 20 min. Após novo resfriamento, a *ABS* das amostras foi obtida a 620 nm em um espectrofotômetro UV-Visível (Genesys<sup>TM</sup>10series, Thermo Electron Co., Wisconsin, USA) e a partir de uma curva padrão de sacarose os resultados foram calculados e expressos em mg de sacarose g<sup>-1</sup> de MS.

### **2.5. Análises estatísticas**

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos (estádios foliolares) e oito repetições (dois folíolos por planta). Os dados referentes aos teores de pigmentos cloroplastídicos obtidos em diferentes seções do limbo e de todos os estádios de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). Os dados referentes às trocas gasosas e concentrações de carboidratos solúveis totais, amido e sacarose foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

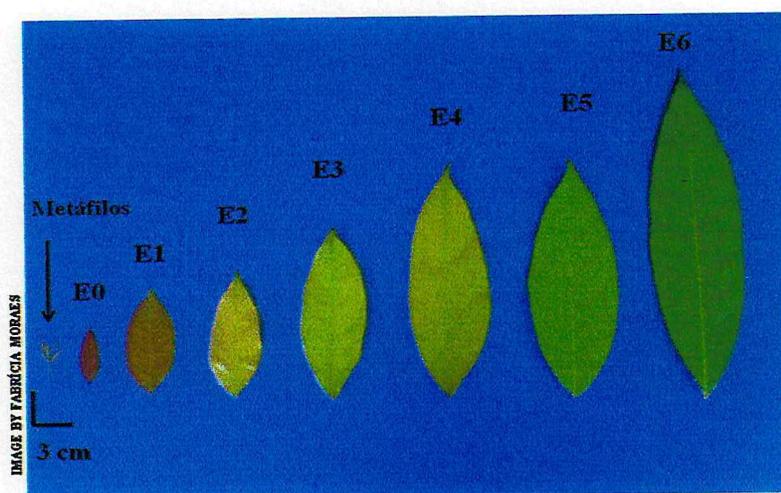
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estádios de desenvolvimento dos folíolos

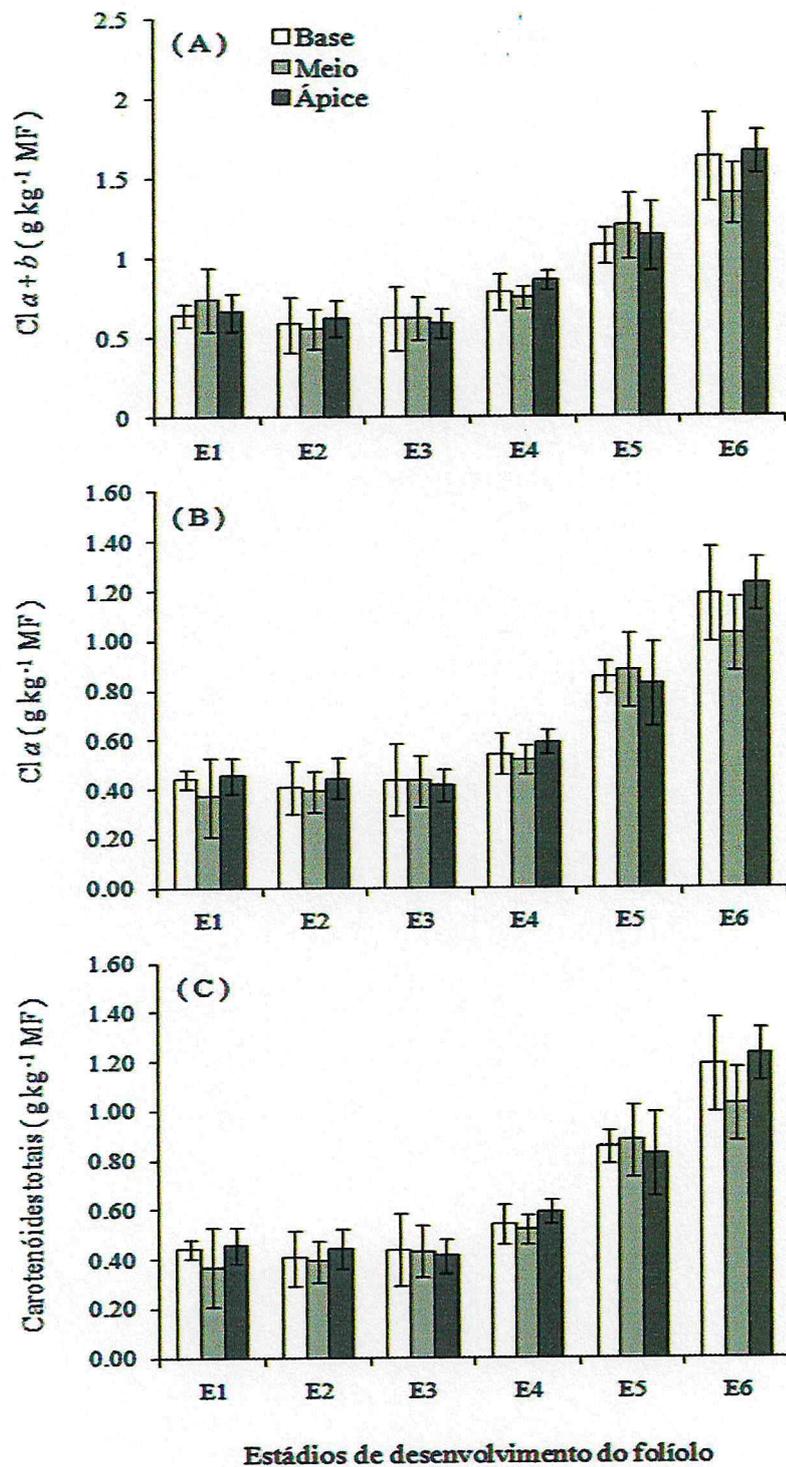
Foram identificados sete estádios de desenvolvimento do folíolo, os quais receberam as denominações de Estádio 0 (E0), Estádio 1 (E1), Estádio 2 (E2), Estádio 3 (E3), Estádio 4 (E4), Estádio 5 (E5) e Estádio 6 (E6), desconsiderando-se nesta classificação o estágio de metáfilo por se referir a folha como um todo e não ao folíolo individual (Figura 2). Esses estádios apresentaram diferenças na coloração do limbo, de forma que E0 e E1 apresentaram coloração em tons de marrom, os estádios E5 e E6 apresentaram coloração em tons de verde (sendo mais forte no E6) e os estádios E2, E3 e E4 apresentaram coloração intermediária entre marrom e verde, caracterizando uma transição na coloração do limbo. Embora tenham sido identificados sete estádios de desenvolvimento, apenas seis deles (do E1 ao E6) foram avaliados neste experimento, devido o E0 não apresentar área de limbo foliolar suficiente para as análises propostas.

#### 3.2. Pigmentos cloroplastídicos

Dentro de cada estágio de desenvolvimento do folíolo, não houve contrastes significativos (teste F,  $P < 0,05$ ) nos teores de pigmentos cloroplastídicos (Cl  $a+b$ , Cl  $a$  e Carotenóides totais) dentre as diferentes porções do limbo foliolar (basal, mediana e apical). Isto evidencia uma distribuição uniforme dos pigmentos cloroplastídicos durante todo o desenvolvimento do folíolo e sugere que o teor de pigmentos cloroplastídicos do folíolo como um todo pode ser estimado pela média das três seções do limbo ou por uma análise pontual de uma determinada seção (Figura 3).

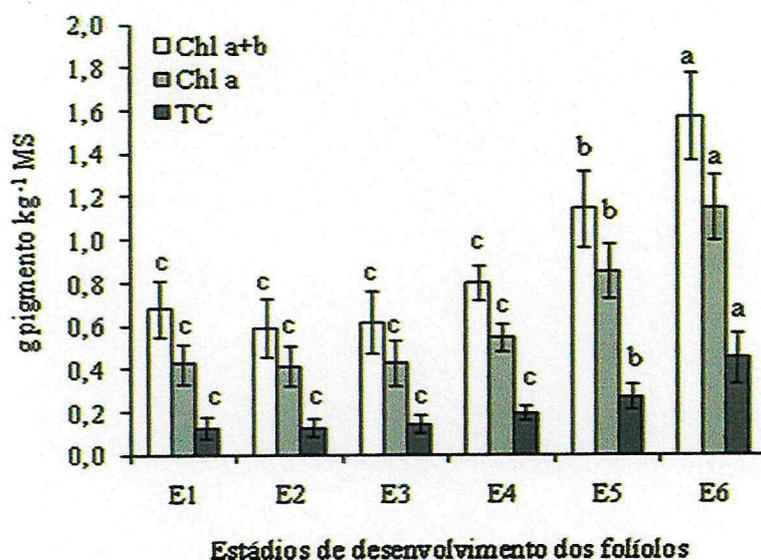


**Figura 2.** Identificação dos estádios de desenvolvimento de folíolos de *C. guianensis*. As siglas E0 a E6 referem-se aos estádios de desenvolvimento dos folíolos.



**Figura 3.** Teores foliares de Clorofila *a+b* (A), Clorofila *a* (B) e carotenóides totais (C) de folíolos de *C. guianensis* em função das porções do limbo e dos diferentes estádios de desenvolvimento (E0 a E6). Os dados são a média de oito repetições  $\pm$  desvio padrão da média Cl: clorofila.

Dessa forma, os dados referentes à Figura 3 foram sumarizados tomando-se como concentrações de cada pigmento a média das três seções avaliadas (basal, mediana e apical). Os dados sumarizados dos pigmentos cloroplastídicos estão apresentados na Figura 4 e evidenciam que os teores de clorofilas *a+b*, clorofila *a* e carotenóides totais não diferiram até o E4 (Figura 4). Para todos os pigmentos avaliados foi verificado um aumento significativo a partir de E5, sendo estes mais expressivos nos folíolos completamente maduros (E6). Comparativamente, a concentração Cl *a+b* aumentou de 0,67 g kg<sup>-1</sup> MS (dado médio do E1 ao E4) para 1,14 e 1,57 kg<sup>-1</sup> MS respectivamente para E5 e E6. A concentração de Cl *a* aumentou de 0,45 g kg<sup>-1</sup> MS (dado médio do E1 ao E4) para 0,85 e 1,15 kg<sup>-1</sup> MS respectivamente para E5 e E6. Finalmente, a concentração de crotenóides totais aumentou de 0,15 g kg<sup>-1</sup> MS (dado médio do E1 ao E4) para 0,27 e 0,45 kg<sup>-1</sup> MS respectivamente para E5 e E6. Não foram apresentados os dados de Cl *b*, pois os mesmos podem ser estimados pela diferença entre Cl *a+b* e Cl *a*. De qualquer forma, ressalta-se que as Cl *b* seguiram os mesmos padrões de comportamento registrados para Cl *a+b* e Cl *a*.

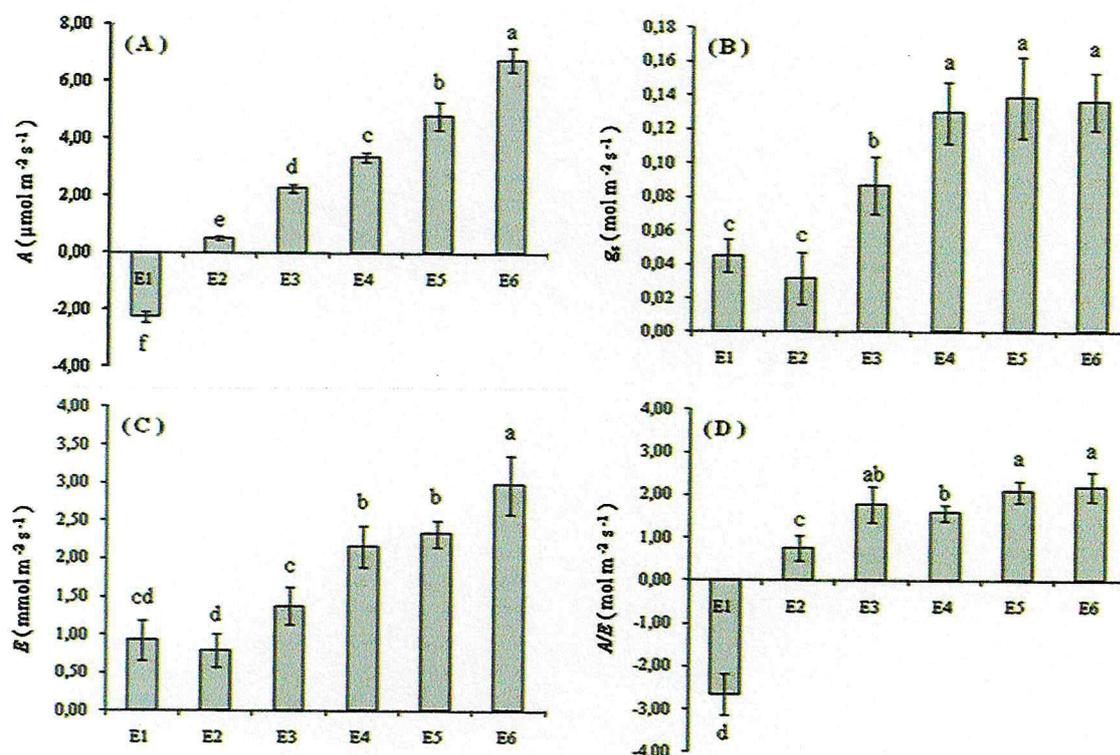


**Figura 4.** Concentrações médias de pigmentos cloroplastídicos (Cl *a+b*, Cl *a* e carotenóides totais) em folíolos de *C. guianensis* de diferentes estádios de desenvolvimento. Os dados são a média de oito repetições  $\pm$  desvio padrão da média.

### 3.3. Trocas gasosas

A  $A$  aumentou significativamente com os estádios de desenvolvimento do folíolo. A média de  $A$  foi negativa apenas para o estágio E1 ( $A = -2,23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), enquanto aumentos sucessivos foram observados entre E2 ( $0,54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e E6 ( $6,78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Figura 5A).

As menores taxas de  $g_s$  foram observadas para E1 e E2, com valores médios de  $0,04 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As maiores  $g_s$  foram observadas para os estádios E4, E5 e E6, cujas médias não diferiram significativamente entre si ( $g_s$  em torno de  $0,14 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Um comportamento intermediário de  $g_s$  foi registrado para o estágio E3 (Figura 5B).



**Figura 5.** Trocas gasosas. Taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ , A), condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ , B), transpiração ( $E$ , C) e eficiência instantânea do uso de água ( $A/E$ , D) em folíolos de *C. guianensis* de diferentes estádios de desenvolvimento (E1 a E6). Os dados são a média de oito repetições  $\pm$  desvio padrão da média. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre médias (Teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

A  $E$  foi menor para E1, E2 e E3, com valores médios variando de  $0,093 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $1,38 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 5C). A maior  $E$  foi registrada em E6 ( $2,97 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e valores intermediários foram obtidos para E4 e E5 ( $2,24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Valores intermediários de  $E$  foram obtidos para o E4 ( $1,38 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e E5 (Figura 5C).

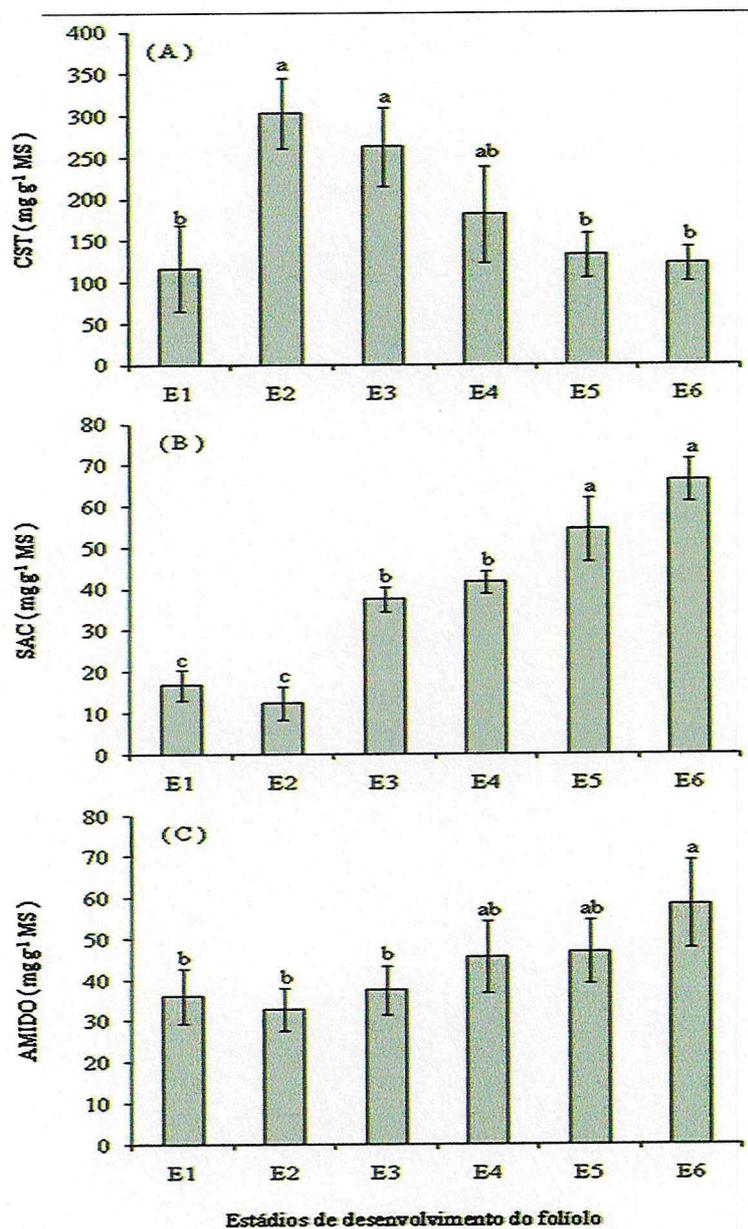
A  $A/E$  foi negativa para E1 ( $-2,65 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Para os demais estádios,  $A/E$  foi sempre positiva, sendo que os menores valores foram registrados para o E2 ( $0,76 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), os maiores para os estádios E5 e E6 ( $2,14 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e os intermediários para E3 e E4 ( $1,68 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Figura 5D).

### **3.4. Concentrações de carboidratos solúveis totais, sacarose e amido**

As concentrações de carboidratos solúveis totais (CST) foram menores para o estádio E1 ( $116,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ), E5 ( $132,3 \text{ mg. g}^{-1} \text{MS}$ ) e E6 ( $121,6 \text{ mg. g}^{-1} \text{MS}$ ), cujos valores não diferiram estatisticamente entre si (Figura 6A). As maiores médias de CST foram obtidas para E2 ( $302,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) e E3 ( $262,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ), enquanto um valor intermediário foi observado em E4 ( $181,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Figura 6A).

Um comportamento crescente nos teores de sacarose foi observado com o desenvolvimento dos estádios foliolares, estando diretamente relacionados à idade do folíolo. De todos os estádios analisados, foram observados menores valores de sacarose para os estádios E1 e E2 (média de  $14,48 \text{ mg g}^{-1}$  de MS) e maiores médias nos estádios E5 e E6 ( $60,23 \text{ mg. g}^{-1}$  de MS). Valores intermediários foram obtidos nos estádios E3 e E4 ( $39,51 \text{ mg. g}^{-1}$  de MS) (Figura 6B).

Foram evidenciadas menores concentrações de amido nos estádios E1, E2 e E3 (média de  $35,42 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) e maiores médias em E6 ( $58,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ). A concentração de amido em E4 e E5 foi, em média, igual a  $46,19 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$  (Figura 6C).



**Figura 6.** Teores foliares de carboidratos solúveis totais (CST, A), sacarose (SAC, B) e amido (Amido, C) em folíolos de *C. guianensis* de diferentes estádios de desenvolvimento. Os dados representam a média de oito repetições  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre médias (Teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Uma das mudanças mais visíveis do desenvolvimento das folhas é sua alteração de cor. Em folhas jovens de muitas espécies aparecem primeiro as folhas de coloração vermelha, roxa, rosa ou menos comumente azul ou branca (HUGHES; MORLEY; SMITH, 2007). A coloração vermelha é a mais encontrada em folhas juvenis; esta característica é causada pela presença de antocianinas contidas nos vacúolos das células da epiderme e/ou células do mesófilo, diminuindo concomitantemente com o desenvolvimento e a maturação foliar (HUGHES; MORLEY; SMITH, 2007).

Foram observados sete estádios diferentes de desenvolvimento de folíolos em andiroba, tendo como base a coloração do limbo dos folíolos (Figura 2). Os resultados indicaram um aumento nos teores de pigmentos cloroplastídicos, sendo maiores no E6 (Figura 4). A coloração verde das folhas está diretamente relacionada aos teores de clorofilas, em especial a clorofila *a*. Portanto, a coloração verde escura observada em E6 é explicada pelas maiores concentrações de Cl *a+b* e Cl *a* (Figura 4).

Os teores de clorofila, por si só, não foram bons indicadores das transições dos estádios foliolares, isto porque as variações nas concentrações de Cl *a+b* e Cl *a* foram muito sutis entre E1 e E4. Embora não tenham sido avaliadas neste experimento, as concentrações de antocianinas nos tecidos devem fornecer melhores subsídios para a distinção entre esses estádios juvenis (E1 a E4).

Comparativamente, as concentrações de pigmentos cloroplastídicos aumentaram durante o desenvolvimento foliar de *Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss.), em especial a Cl *a* (BERGONCI, 1981; MIGUEL et al., 2007). Watanabe, Yamaguchi, Nishimura (1995) constataram que o conteúdo de antocianinas diminuiu significativamente nas diversas fases de desenvolvimento da folha de manga (*Mangifera indica*), enquanto os teores de clorofilas aumentaram à medida que as folhas mudavam de um estágio de coloração marrom chocolate e aspecto suave para coloração verde e aspecto coriáceo.

Os pigmentos cloroplastídicos são responsáveis pela captura de luz usada no processo fotossintético, sendo as Cl *a* os pigmentos mais importantes, pois são encontradas em maior quantidade e são os principais componentes dos fotossistemas I e II. (em que região) As Cl *a* são essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH durante a fase fotoquímica da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009, CRUZ et al, 2004).

Por outro lado, os carotenóides, moléculas essencialmente hidrofóbicas, são tipicamente encontrados associados às moléculas de clorofila, desempenhando uma função estrutural, ou seja, participam da formação dos fotossistemas. Apesar de evidências indicarem que os carotenóides aumentam a eficiência fotossintética por absorverem luz verde-azulada e transferirem esta energia às clorofilas (TELFER, 2002), seu papel mais importante está relacionado à fotoproteção do aparato fotossintético dissipando excessos de energia na forma de calor (MITTLER, 2002). Embora não haja uma relação linear, espera-se que quanto mais velho for o folíolo e quanto maior for sua concentração de Cl *a*, maior será a capacidade dos fotossistemas em absorver e transferir energia entre os centros de reação. Isto poderia explicar os aumentos na síntese de carotenóides totais em função dos estádios de desenvolvimento dos folíolos de andiroba (Figura 4), funcionando como medida preventiva de dissipação de excessos de energia, a fim de prevenir fotoinibição e danos foto-oxidativos (MITTLER, 2002).

Com relação à influência da idade fisiológica da folha sobre a capacidade fotossintética, vários trabalhos, em diversas espécies vegetais, demonstraram que a capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> é baixa nas folhas em início de expansão, atingindo valores máximos quando estas se tornam expandidas e declinando posteriormente com o avanço da idade foliar.

Em *Mangifera indica* foi demonstrado que a fotossíntese aumentou gradualmente com o desenvolvimento da folha (WATANABE; YAMAGUCHI; NISHIMURA, 1995). A fotossíntese em folhas imaturas, de coloração “marrom chocolate”, foi inferior ao ponto de compensação de CO<sub>2</sub>. Valores intermediários de *A* foram obtidos quando as folhas tornaram-se castanho-avermelhadas e valores de *A* acima do ponto de compensação de CO<sub>2</sub> foram obtidos quando as folhas tornaram-se verdes e maduras (WATANABE; YAMAGUCHI; NISHIMURA, 1995). Essas folhas diferiram principalmente com relação às maiores quantidades de antocianinas e baixas concentrações de rubisco (Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxidase) nas folhas novas (“marrom chocolate”). Em contra partida, nas folhas verdes a concentração de rubisco aumentou, estando diretamente relacionado ao aumento em *A* (WATANABE, YAMAGUCHI, NISHIMURA, 1995).

Resultados similares foram também observados durante o desenvolvimento foliar em clones de *Hevea brasiliensis*, cuja *A* foi negativa até o estágio B2 (folhas jovens com 32 dias de idade) em razão dos reduzidos teores de clorofilas, menor *g<sub>s</sub>*, alta

concentração interna de  $\text{CO}_2$  e baixa fluorescência de clorofilas (MIGUEL et al., 2007). Somente a partir do estágio C (folhas intermediárias com 37 dias de idades), a  $A$  tornou-se positiva e gradativamente maior, estimulada por aumentos nos teores de clorofilas, eficiência fotoquímica do fotossistema II, eficiência de carboxilação, condutância estomática, transpiração e eficiência no uso da água (MIGUEL et al., 2007).

Em cafeeiros, a  $A$  é baixa nas folhas em início de expansão, alcançando valores máximos nas folhas recém expandidas e decrescem tornando-se constantes com a idade nas folhas maduras fisiologicamente (FAHL et al., 2001).

Bauer e Thoni (1988) estudando características fisiológicas e anatômicas de folhas jovens e adultas de *Hedera helix* observaram que, sob alta luminosidade, a fotossíntese líquida, a saturação lumínica, a eficiência de carboxilação, a atividade da rubisco, as proteínas solúveis, a espessura da folha e a espessura do parênquima paliádico e lacunoso em folhas maduras (ou fase adulta como denominado pelos autores) foram maiores em comparação às folhas juvenis. Em geral, as folhas juvenis de *Hedera helix* apresentaram características similares às das folhas de sombra.

Bergonci (1981) verificou que índices mais elevados de  $A$  e condutância estomática ( $g_s$ ), foram encontrados nas folhas completamente expandidas do clone Fx 2261 (fase D) de *H. brasiliensis*. Por outro lado, em folhas jovens (fase B2) a  $A$  foi negativa ou nula, com valores de  $g_s$  relativamente baixos em relação às folhas maduras (fase D). Isto sugere que a  $g_s$  depende, principalmente, da transformação de células pré-estomáticas em estômatos funcionais durante desenvolvimento foliar.

Neste experimento, a  $A$  aumentou com o desenvolvimento dos folíolos de andiroba (Figura 5). Pelo menos em partes esta resposta pode ser explicada pelos significativos incrementos nas concentrações foliolares de  $\text{Cl } a$ , bem como pelas maiores taxas de  $g_s$ , principalmente observadas a partir de E3. Conforme explicado anteriormente, quanto maior a concentração de  $\text{Cl } a$  maior deverá ser o incremento em  $A$  em resposta à maior eficiência da fase fotoquímica da fotossíntese. Por outro lado, quanto maior a  $g_s$ , maior será o influxo de  $\text{CO}_2$  às folhas, permitindo uma maior atividade da Rubisco.

Além da  $g_s$  favorecer a  $A$ , os resultados sugerem que esta espécie apresenta um eficiente controle estomático da  $E$ . Isto porque a  $E$  apresentou padrão similar de

resposta àquele observado para  $g_s$  (Figura 5), ou seja, quanto menor foi a  $g_s$  (E1, E2 e E3) menor foi a  $E$  resultante e vice-versa, como observado nos estádios E4, E5 e E6.

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por Silva (2009), que embora tenha trabalhado apenas com folíolos maduros de andiroba, demonstrou o acoplamento entre  $E \times g_s$ , inclusive sob condições de déficit hídrico. Com efeito, as variações em  $A$  e  $E$  explicam as diferenças observadas na  $A/E$  nos folíolos de diferentes estádios de desenvolvimento.

O carbono fixado pelas folhas pode ser alocado para três caminhos metabólicos: (i) para utilização no metabolismo respiratório celular, fornecendo energia (ATP) e esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos; (ii) para a síntese de carboidratos de transporte (sacarose), exportados para os diversos drenos da planta; e (iii) para síntese de compostos de armazenamento (amido), para utilização durante a respiração noturna e em momentos em que a fotossíntese diminui em função das variações nas condições ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Martinazzo et al (2007), quando uma planta entra em crescimento ativo, o metabolismo dos carboidratos se torna mais intenso e o incremento da sacarose se dá às custas da produção de carboidratos através da fotossíntese. Parte dos carboidratos gerados pela fotossíntese (fotoassimilados) em folhas maduras (fontes) é utilizada para satisfazer as necessidades das células dessas próprias folhas. A parcela excedente de carboidratos é utilizada para a síntese de amido nos cloroplastos ou pode ser exportada aos drenos (folhas juvenis flores, frutos, raízes, etc.) na forma de sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O destino do carbono nos tecidos fotossintéticos depende, portanto, do estágio de desenvolvimento foliar. Folhas imaturas retêm grande parte dos fotoassimilados para síntese de seus constituintes celulares (proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos, celulose, aminoácidos etc.), podendo inclusive importar fotoassimilados de outras partes da planta. Em folhas maduras (fonte), ao contrário, grande parte dos fotoassimilados é exportada através do floema para outras regiões da planta (KERBAUY, 2008).

Estas diferenças entre folhas jovens e maduras se dão, principalmente, devido ao acelerado ritmo de crescimento das folhas jovens, as quais demandam grandes quantidades de ATP para seu intenso metabolismo. Isto pode explicar as diferenças nas trocas gasosas observadas entre folíolos jovens e maduros de andiroba. Assim, uma relação aparentemente direta entre  $A$ , concentração de amido e de sacarose foi

observada em função do estágio de desenvolvimento dos folíolos. Portanto, quanto maior foi a *A*, mais trioses fosfatadas devem ter sido produzidas nos cloroplastos, explicando a maior capacidade de síntese de amido (nos cloroplastos) e de sacarose (no citosol). O acúmulo de amido em folhas de diferentes estádios de desenvolvimento foi também observado em manga (*Mangifera indica*), sendo as maiores concentrações encontradas nos cloroplastos de folhas maduras (WATANABE; YAMAGUCHI; NISHIMURA, 1995).

Finalmente, não foi possível inferir sobre uma relação direta entre *A* e CST em função dos estádios de desenvolvimento do folíolo. Isto porque as concentrações de CST devem estar mais relacionadas à partição desses compostos, principalmente com relação à glicose, que pode ser usada tanto na síntese de sacarose quanto na síntese de amido. Possivelmente, a maior parte dos CST que chegam nos folíolos em E1 devem ter sido direcionadas à síntese de amido e respiração, enquanto as maiores concentrações de CST nos estádios E2, E3 e E4 devem estar relacionadas ao maior crescimento (divisão e expansão) do limbo foliolar, o qual demanda de grande quantidade de energia (ATP). Por outro lado, as menores concentrações de CST nos estádios de maior *A* (E5 e E6) podem ser explicadas pelas maiores concentrações de sacarose e amido nesses folíolos. Possivelmente, estes devem funcionar como verdadeiras fontes exportadoras de assimilados.

## 5. CONCLUSÃO

Os folíolos de andiroba não podem ser diferenciados exclusivamente pelas suas concentrações de pigmentos cloroplastídicos (Cl  $a+b$ , Cl  $a$  e carotenóides totais). Porém, o acúmulo de pigmentos cloroplastídicos é uniforme ao longo do limbo foliolar, independentemente do estágio de desenvolvimento do mesmo, e pode ser estimado pela análise pontual de qualquer região do folíolo.

A  $A$  aumenta linearmente com o estágio de desenvolvimento do folíolo, causando aumentos proporcionais nas concentrações de sacarose e amido.

A partir do E4, a  $g_s$  não explica variações em  $A$ , porém estão intimamente relacionadas à  $E$ .

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, H.; THONI, W. Photosynthetic light acclimation in fully developed leaves of juvenile and adult life phases of *Hedera helix*. **Physiologia Plantarum**, v. 73, p. 31-37, 1988.

BRAGA, G. J.; PEDREIRA, C.G.S.; HERLING, V. R. et al. Sward structure and herbage yield of rotationally stocked pastures of 'Marandu' palisade grass [*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf] as affected by herbage allowance. **Scientia Agricola**, v.63, p. 121-129, 2006.

BERGONCI, J. I. Estudos ecofisiológicos relacionados com o balanço de CO<sub>2</sub> durante a ontogenia foliar em (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.). 1981. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

BONDADA, B. R.; OOSTERHIUS, D. M. Relationships between nitrogen content and net gas Exchange components of a cotton leaf during ontogeny. **Photosynthetica**, v. 35, p. 631-635, 1998.

CRUZ, J. A.; AVENSON, T. J., KANAZAWA, A.; TAKIZAWA ,K.; EDWARDS, G. E.; KRAMER, D. M. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. **Journal of Experimental Botany** ,v. 56, p. 395-406, 2004.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annalical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C.; MAGOSSI, R.; ALFONSI, E. L.; PEZZOPANE, J. R. M. Estudo da enxertia de cultivares de *Coffea arabica* sobre *C. canephora* nas características fotossintéticas e de fluxo de seiva. In: II SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001b, Vitória – ES. Anais... Brasília: Embrapa Café Minasplan. p.17, 2001.

HUGHES N. M., SMITH W. K. Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. **American Journal of Botany** v. 94, p. 784–790, 2007.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody plants**. 2 ed. Academic press limited, 1997.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water Relations of Plants and Soils**. San Diego: Academic Press, p.495, 1995.

LICHTHENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, Editora UFV. 451p. 2005.

MARTINAZZO, E. G.; ANESE, S.; WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, L. H. Efeito do Sombreamento sobre os Teores de Carboidratos Não-estruturais de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 168-170, jul. 2007

MIGUEL, A. A., OLIVEIRA, L. E. M., CAIRO, P. A. R., OLIVEIRA, D. M. Photosynthetic behaviour during the leaf ontogeny of rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss.) UELL. ARG.], in Lavras MG. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 1, p. 91-97, jan./fev., 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Artemed, 2009. 819p.

TELFER, A. What is b-carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, London, v.357, n.1426, p.1431-1440, Oct. 2002.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, v. 22, p. 280-283.

WATANABE, N. N.; YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M. Changes of anatomical features, photosynthesis and ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase content of mango leaves. *Annals of Botany*, v.76: p. 649-656, 1995.

### CAPÍTULO III

## CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DOS FOLÍOLOS DE PLANTAS JOVENS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

### RESUMO

Diferenças qualitativas na anatomia dos folíolos de plantas jovens de *Carapa guianensis* (Aubl.) em diferentes estádios de desenvolvimento foi analisada por meio da comparação da organização estrutural e microquímica dos folíolos desta espécie. Diferenças quantitativas foram averiguadas apenas para frequência estomática e de tricomas. As técnicas anatômicas de dissociação de epiderme, seções transversais, e coloração diferenciada para teste microquímico, com auxílio de microscopias de luz e eletrônica de varredura foram utilizadas. Foi constatado, que nos diferentes estádios de desenvolvimento do folíolo de *C. guianensis*, estruturas anatômicas como a camada de cera epicuticular, epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso, estômatos, nectários extraflorais, tricomas, cristais e amido são comuns a todos os estádios de desenvolvimento. Foi verificado que o folíolo é anfiestomático e possui simetria dorsiventral relativamente bem definida. Os estômatos são anomocíticos, presentes em maior frequência na superfície abaxial. Em seção transversal a margem é do tipo fletida e revoluta com feixes de fibras delimitando-a. A nervura central é composta por células esclerenquimáticas com xilema voltado para a face adaxial e floema para a face abaxial. Foi observada a presença de cristais, mais ou menos esféricos (drusas), encontrados quase sempre aos pares e em maior frequência na superfície abaxial dos folíolos e nas impressões das nervuras secundárias. Em relação às substâncias ergásticas, foi diagnosticada a presença de bainha amilífera e presença de grãos de amido no parênquima paliçádico de todos os estádios de desenvolvimento, no entanto, o maior acúmulo de amido foi visualmente constatado para os estádios de desenvolvimento mais maduros (E5 e E6).

**Palavras chave:** Andiroba, Anatomia foliar, Desenvolvimento foliar, Estômatos, Nectários extraflorais, Tricomas.

## ABSTRACT

Qualitative differences in anatomical structures were evaluated according leaflet developmental stage (LDS) of *Carapa guianensis* (Aubl.) by determining its structural organization using microscopic and micro-chemical techniques. Quantitative assessments were performed just for leaflet frequencies of stomata and trichomes. There were no marked differences in anatomical structures disregarding LDS. Therefore, leaflets from all developmental stages presented similar deposition of epicuticular wax layer, similar cell arrangement in both adaxial and abaxial epidermises, and mesophyll tissue characterized by palisade and sponge parenchyma forming a dorsiventral symmetry. Leaflets were hypostomatic from E1 to E3 and amphystomatic from E4 to E6, however, stomata were anomocytic regardless LDS. Extrafloral nectaries, glandular and tector trichomes, crystals and starch were common to all LDS. The midrib was composed by sclerenchyma cells with xylem facing the adaxial epidermis and phloem faced to abaxial epiderm. Slightly spherical crystals (drusen) were commonly found in pairs, with greater frequency in abaxial epidermis and in secondary veins. A starch sheath was found regardless LDS, however, higher starch accumulation was clearly evident in mature LDS (such as E5 and E6) rather than in juvenile (E1 to E4).

**Keywords** Andiroba; Extrafloral nectaries, Leaf anatomy, Leaf development, Stomata, Trichomes.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Carapa* é constituído de árvores de médio a grande porte, pertencente à família Meliaceae. A denominação do gênero deriva de “garapa”, nome utilizado por diversas tribos da América do Sul para designar o óleo produzido a partir das sementes destas árvores.

As plantas desta família, como por exemplo, a andiroba, o cedro e o mogno brasileiro, são árvores de aproximadamente 20 a 30 m de altura quando adultas e arvoretas, de 3 a 10 m de altura. Apesar das espécies pertencentes a esta família apresentarem madeira de excelente qualidade e, dessa forma, alto valor de mercado, tem seus aspectos botânicos e ecológicos pouco estudados (SILVA; NISHIOKA, 2007).

A andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) está entre as espécies mais cotadas para uso em projetos de reflorestamento, inclusive em SAFs (sistemas agroflorestais), em razão de seu potencial econômico. Essa espécie tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde os Neotrópicos à África Tropical. Ocorre no sul da América Central, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Brasil (FERRAZ et al., 2002).

No Brasil, ocorre em toda a bacia Amazônica, preferencialmente nas várzeas e áreas alagáveis ao longo dos igapós. Frequentemente, a andiroba apresenta-se naturalmente associada à ucuúba (*Virola guianensis*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (CAVALCANTE et al., 1986). Mantém-se produtiva por até 40 anos, com produção aproximada em torno de 120 kg de sementes por ano, advindo, na sua maioria, de exploração extrativista (SHANLEY et al., 1998). Visando aumentar a produtividade da andiroba, plantios comerciais da espécie têm sido estimulados. Porém, não há ainda acessos geneticamente selecionados ou melhorados que agreguem características agrosilviculturais desejáveis do ponto de vista econômico. A seleção e propagação de materiais genéticos tolerantes à seca e resistentes a pragas, bem como daqueles mais produtivos e com perfil graxo adequado no óleo são objetos de busca a qual envolve conhecimentos básicos sobre a espécie.

Dos conhecimentos básicos, interessam aprofundamentos teóricos com relação à anatomia foliar da espécie, visto que esta apresenta íntima relação para com os processos fisiológicos e bioquímicos, tais como fotossíntese e transpiração, ambos dependentes das trocas gasosas realizadas pelos estômatos. Os estômatos desenvolvem-se durante o processo de desenvolvimento da folha e estão relacionados às trocas

gasosas, atuando na entrada e saída de ar e água do interior dos órgãos onde estão localizados.

Os estômatos são classificados por Metcalfe e Chalk (1950) em cinco tipos básicos, de acordo com o formato e arranjo das células subsidiárias em: anomocítico, anisocítico, paracítico, diacítico e actinocítico. Na lâmina foliar estão distribuídos aleatoriamente, podendo ser influenciados pela mudança ambiental. Ademais algumas espécies apresentam estômatos em ambas epidermes (anfiestomática) enquanto outras concentram seus estômatos apenas na epiderme abaxial (hipoestomática).

Essas informações são de crucial importância, dada sua interface para com os processos fisiológicos. Por exemplo, a frequência (densidade) e tipo dos estômatos influenciam diretamente as trocas gasosas, ou seja, o influxo de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese e a perda de água para a atmosfera na forma de vapor, pelo processo de transpiração, logo contribuem para o crescimento e produção vegetal (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O estudo do desenvolvimento foliar é de grande importância para a avaliação do crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como têm sido utilizado como subsídio para os estudos de ecofisiologia, principalmente de balanço hídrico e capacidade fotossintética, uma vez que as folhas constituem o aparato fotossintético e são responsáveis pela formação de carboidratos que são alocados para os órgãos vegetativos e reprodutivos da planta (BASTOS et al., 2002).

Do ponto de vista ontogênico, vários ciclos de divisão celular predominam nos estádios iniciais do desenvolvimento do primórdio foliar e nos estádios posteriores, quando a folha alcança seu formato e tamanho final, tanto os ciclos de divisão quanto os de expansão celular são importantes (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997). É durante este último ciclo que ocorre a diferenciação celular, estabelecendo-se características anatômicas finais, produzindo os mais diversos tipos de estruturas, as quais variam consideravelmente dentre as diferentes espécies.

Considerando-se a ocorrência de seis estádios de desenvolvimento de em folíolos de andiroba capítulo II (vide página 28), é possível que estes apresentem diferenças anatômicas consideráveis, tais como alterações no parênquima, produção de estruturas ou apêndices epidérmicos, síntese de cristais, etc.

Portanto, este estudo teve por finalidade caracterizar qualitativamente as estruturas anatômicas durante o desenvolvimento dos folíolos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.),

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

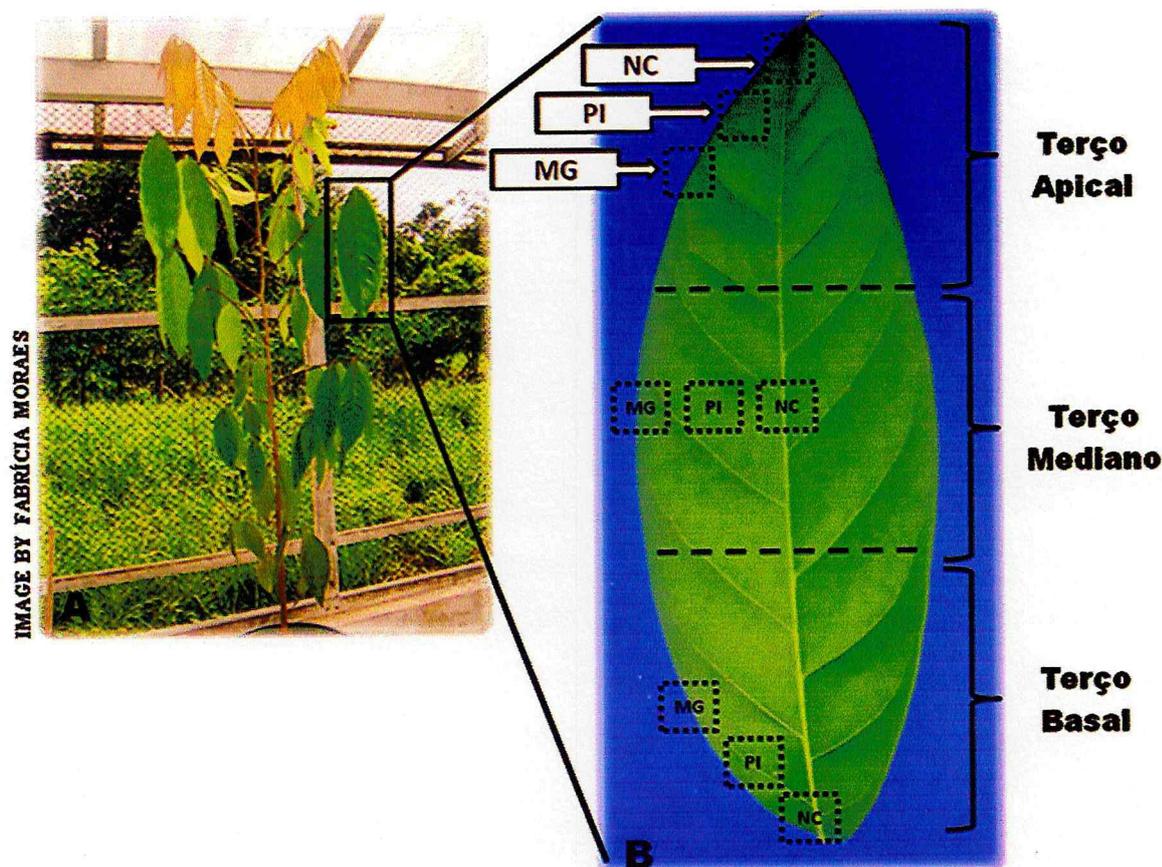
### ***2.1. Material vegetal, identificação dos estádios de desenvolvimento dos folíolos e amostragens***

Sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) foram coletadas de árvores adultas no campus da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém-PA (01°28'03"S, 48°29'18"W), no mês de fevereiro de 2009. As sementes foram embebidas em água por 24 h e semeadas em sacos de polietileno de 15 cm de diâmetro por 27 cm de altura para a uniformização das mudas. Após 60 dias do semeio, as mudas foram transplantadas para vasos de 20 L (uma muda por vaso), preenchidos com um latossolo amarelo textura média, previamente peneirado (malha de 4") para a retirada de impurezas. Para a correção da acidez do substrato foi aplicado 2,7 g de calcário dolomítico por vaso e para a fertilização nitrogenada foi utilizado 1,65 g de uréia por vaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal Rural da Amazônia, onde, durante todo o período experimental, as plantas foram irrigadas diariamente com a finalidade de repor a água perdida por evapotranspiração. Quando as plantas atingiram oito meses de idade, amostras de folíolos referentes a cada estágio de desenvolvimento foram coletadas em álcool etílico 70% para as análises anatômicas.

Os estádios de desenvolvimento dos folíolos foram estabelecidos conforme capítulo II (vide páginas 24 e 28).

## 2.2. Obtenção de cortes histológicos

Para a análise anatômica, folíolos de diferentes estádios coletados foram divididos em três seções: apical, mediana e basal, de onde foram retiradas amostras das regiões da nervura central, margem e porção intermediária às duas anteriores (Figura 1). Os cortes foram feitos à mão livre com auxílio de lâminas de aço. A montagem das lâminas semi permanentes foi feita em glicerina, sendo montada entre lâmina e lamínula.



**Figura 1.** Plantas jovens de andiroba. **A.** *Carapa guianensis*, **B.** Detalhe do folíolo de andiroba indicando as regiões utilizadas como amostras para análises anatômicas. NC-nervura central; MG-margem; PI-porção intermediária.

### 2.2.1. Dissociação de epidermes para visualização e determinação de frequência estomática e de tricomas

Seções das regiões: apicais, medianas e basais do folíolo foram fixadas em hipoclorito de sódio comercial por três dias, substituídas a cada 24 horas, até clarificação completa. Após completa separação, as epidermes adaxiais e abaxiais foram lavadas em água destilada, onde foi retirado o mesófilo excedente com auxílio de pincéis. Posteriormente, foram coradas com safranina básica 1% (BRAGA, 1988).

### **2.2.2. *Frequência estomática e de tricomas***

Para estas análises, foi coletado um folíolo de cinco plantas de cada estágio de desenvolvimento (do E1 ao E6), totalizando 30 folíolos. Cada um deles foi subdividido nas seções apical, mediana e basal. Em cada seção, foram feitas contagens aleatórias em 30 campos visuais diferentes, com o auxílio de ocular milimetrada em microscópio óptico Zeiss Axiolab DRB-KP. Cada campo visual possuiu a área de  $0,2 \text{ mm}^2$ . Os dados obtidos foram expressos em número de estômatos ou tricomas  $\text{mm}^{-2}$ .

### **2.2.3. *Obtenção de Fotomicrografias e Eletromicrografias***

Estas técnicas foram utilizadas com o objetivo de: (i) caracterizar a estrutura estomática e a posição dos estômatos na epiderme, (ii) caracterizar os apêndices epidérmicos (tricomas e nectários extra florais), (iii) caracterizar a estrutura anatômica do limbo foliolar e de suas margens, (iv) averiguar a formação de cristais de oxalatos de cálcio (drusas) e amido.

Para obtenção de fotomicrografias em microscópio ótico as amostras de folíolos de diferentes estádios de desenvolvimento foram conservadas em álcool etílico 70%. Fragmentos de folíolos foram reidratados em série etílica decrescente. A seguir, as seções foram clarificadas em solução aquosa de hipoclorito ( $\text{NaClO}$ ) comercial na concentração de 50%, para obtenção de seções transversais e paradérmicas.

A coloração dos cortes foi realizada com azul de astra e fucsina básica 1% (KRAUS, ARDUIN, 1997) e para a montagem das lâminas foi utilizado glicerina 50% aquosa, entre lâmina e lamínula, isolando-se os bordos da lâmina com esmalte incolor. As fotomicrografias foram realizadas em vários aumentos com auxílio de fotomicroscópio Zeiss Axiolab HBO 50 e câmera digital Canon Power Shot A640 acoplada (Laboratório de Anatomia Vegetal - MPEG).

Para as eletromicrografias, as amostras dos folíolos foram desidratadas pela série etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 96, 100%), num período total de duas horas e 20 minutos, segundo Johansen (1940). Em seguida, foram processadas em secador de ponto crítico, fixadas em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla face e metalizadas com ouro durante dois minutos e meio. O material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP, pertencente ao Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do MPEG (Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém- PA).

### ***2.3. Montagem das lâminas para os testes microquímicos***

Foram obtidos cortes das amostras de folíolos dos seis estádios de desenvolvimento, à mão livre e no sentido transversal. Os cortes foram mantidos em álcool 70% e posteriormente reidratados em série etílica decrescente. Após clarificação em hipoclorito de sódio 50%, os mesmos foram lavados em água destilada e transferidos para lâminas, retirando-se o excesso da água com o auxílio de papel filtro. Os reagentes referentes a cada teste microquímico (item 2.4) foram instilados sobre os cortes em suas respectivas lâminas, sendo o excesso retirado com papel filtro para montagem final da lâmina com glicerina 50%. Após a aplicação da lamínula foi realizada a vedação com esmalte (KRAUS; ARDUIN, 1997).

### ***2.4. Testes microquímicos***

Foram realizados para identificação de cristais de oxalato de cálcio e grãos de amido, seguindo técnica usual em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; COSTA, 1982).

Para a visualização de cristais foi realizada a reação de dissolução utilizando-se o ácido sulfúrico concentrado, o qual foi instilado sobre os cortes por cerca de 1 a 2 minutos, seguindo-se da montagem das lâminas.

Para a visualização do amido, uma solução de lugol 1% foi instilada sobre os cortes, aguardando-se de 1 a 2 min, para então finalizar a montagem das lâminas (COSTA, 1982). A presença de amido é evidenciada pela coloração azulada ou violácea na presença do reagente.

### 3. RESULTADOS

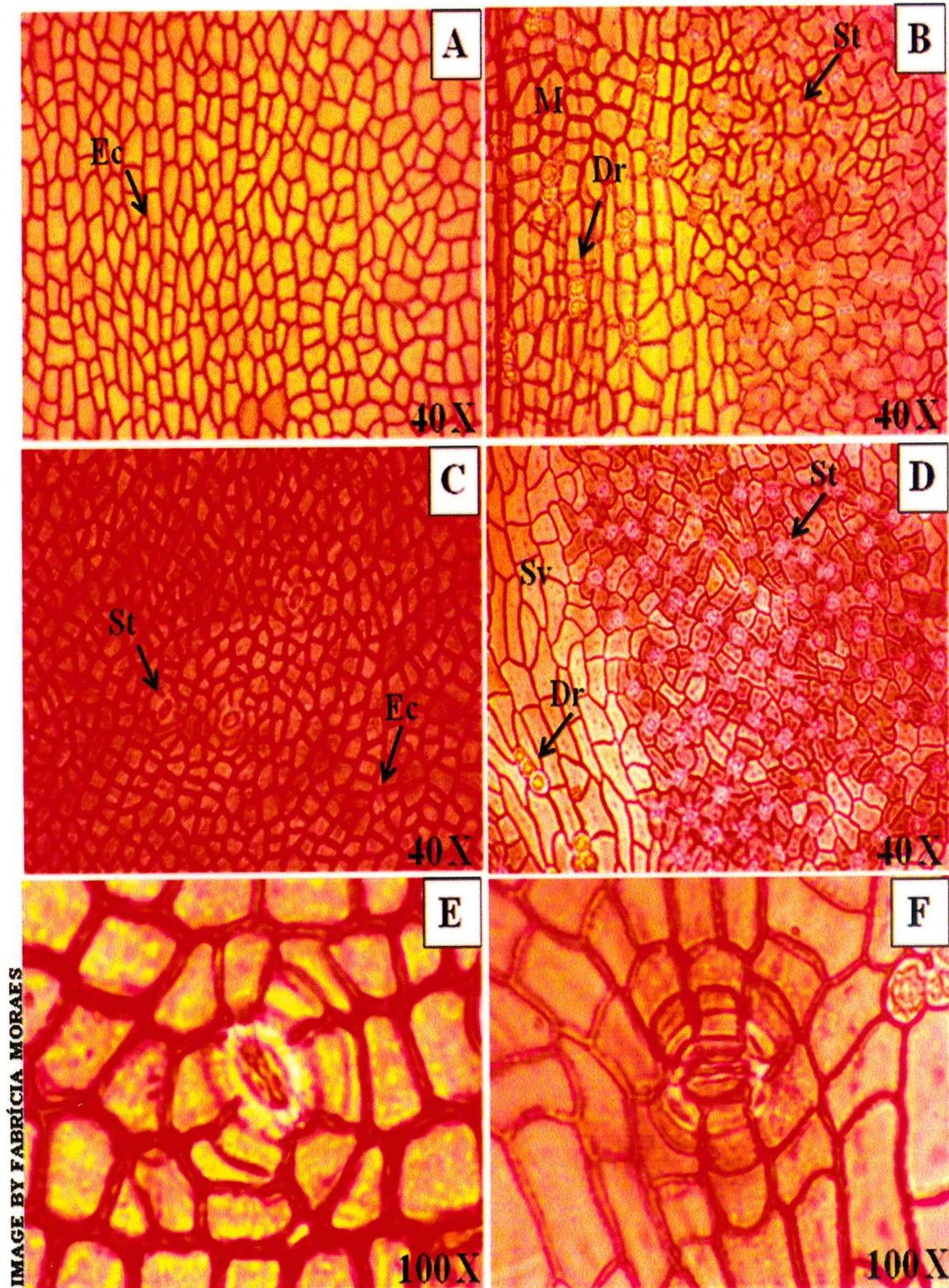
#### 3.1. Epiderme

Considerando-se os diferentes estádios de desenvolvimento do folíolo, apenas poucas diferenças qualitativas nas estruturas anatômicas foram identificadas. Tanto a epiderme adaxial quanto abaxial em todos os estádios de desenvolvimento são formadas por células justapostas, com paredes periclinais e anticlinais lisas de formato irregular (Figura 2A, 2B, 2C e 2D). Sobre as nervuras, as células da face adaxial possuem formato semelhante às células epidérmicas do limbo (Figura 2A e 2C), enquanto as da face abaxial (Figura 2B e 2D) apresentam formato retangular.

Em corte transversal, as epidermes de ambas as faces apresentaram-se uniestratificadas, com formato quadrangular na face adaxial e retangular na face abaxial (Figura 3A e 3B). A epiderme adaxial é revestida por cutícula lisa, com predominante deposição de ceras epicuticulares lisas e em menor frequência floculadas (Figura 3C), que com o desenvolvimento do folíolo (E6) passam a ser predominantemente floculadas em detrimento das lisas (Figura 3D).

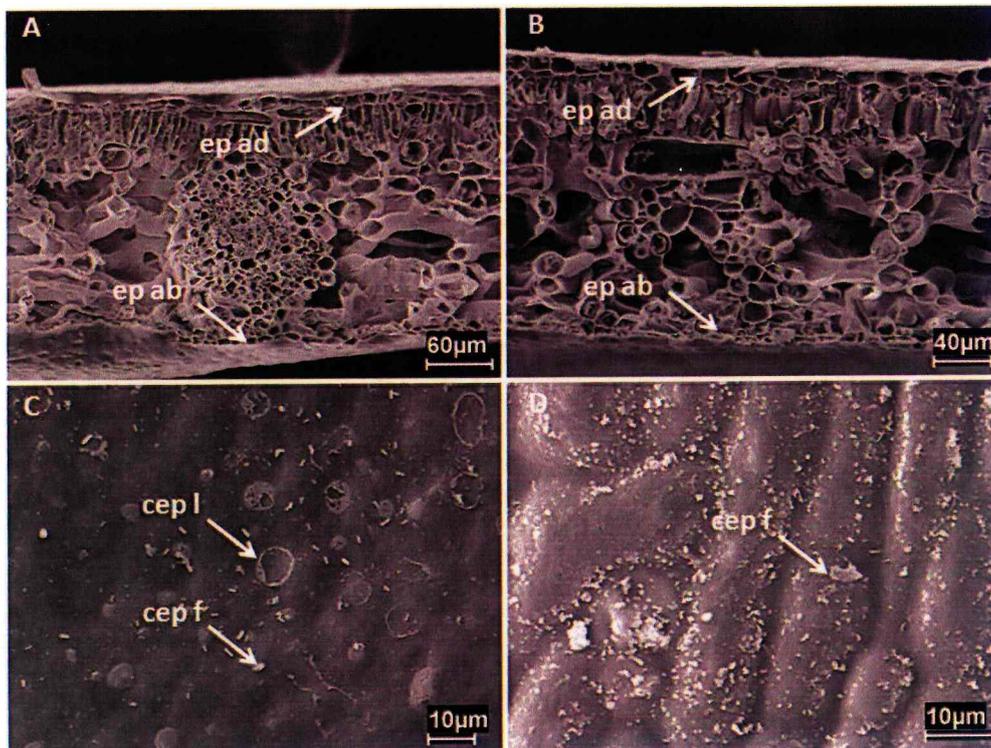
Nos estádios de desenvolvimento E1 até E3, foi observada a ocorrência de estômatos apenas na epiderme abaxial. Como ilustração, vide Figura 2A e 2B referente ao folíolo em E1. Do estágio E4 ao E6, foram encontrados estômatos em ambas as epidermes, embora os cortes paradérmicos indiquem uma maior frequência estomática na epiderme abaxial. Como ilustração, vide Figura 2C e 2D referente ao folíolo em E6. Essas observações permitem inferir sobre uma classificação diferencial dos folíolos com relação à ocorrência de estômatos durante seu desenvolvimento, ou seja, até E3 os folíolos são hipoestomáticos, enquanto de E4 a E6 são anfiestomáticos. Ressalta-se, no entanto, que a ocorrência de estômatos na epiderme adaxial de folíolos em E4, E5 e E6 predomina sobre a nervura central (Figura 2C, referente ao estágio E6), enquanto na epiderme abaxial estes estão amplamente distribuídos por todo o limbo foliolar (Figura 2D, referente ao estágio E6).

Em todos os estádios de desenvolvimento do folíolo em que foram observados estômatos, independente da epiderme (adaxial ou abaxial), foi possível classificar os mesmos como anomocíticos, com células guardas ladeadas por um número variável de células companheiras muito semelhantes às demais células epidérmicas (Figura 2E e 2F, referentes a um estômato típico de epidermes adaxial e abaxial em E6).

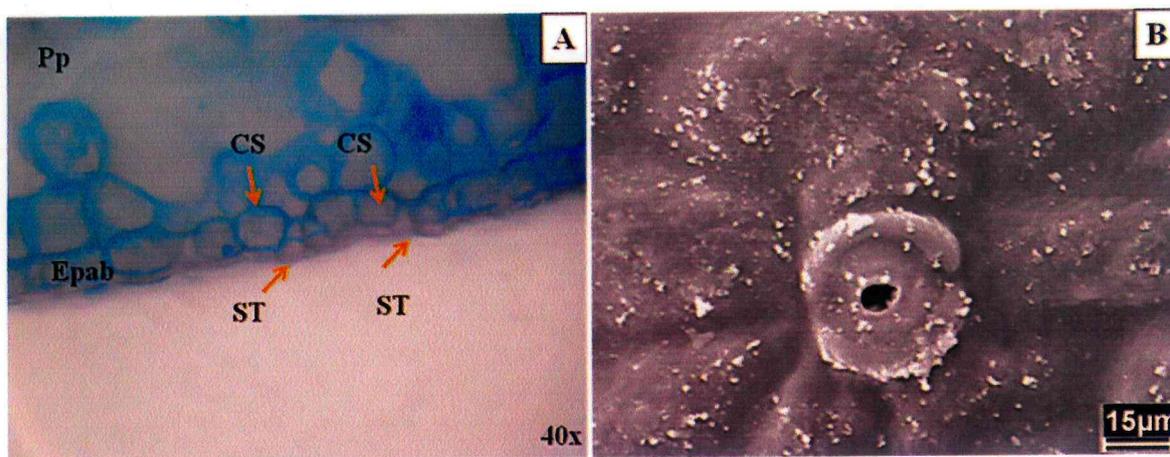


**Figura 2.** Imagens paradérmicas de folíolos de *C. guianensis* em estágio E1 (Fig. 2A e 2B) e estágio E6 (Fig. 2C e 2D). Detalhe de estômato anomocítico e células subsidiárias em epiderme adaxial (Fig. 2E) e abaxial (Fig. 2F) em folíolos em estágio E6. As siglas Ec, St, Dr, M, Sv referem-se respectivamente às células epidérmicas, estômatos, drusas, nervura central e nervura secundária.

Em corte transversal por microscopia de luz e paradérmico por MEV, foi possível inferir que os estômatos ocorrem sempre no mesmo nível das demais células epidérmicas de ambas as superfícies adaxial e abaxial. (Figura 4A). Como ilustração representativa de todos os estádios de desenvolvimento, vide Figura 4.



**Figura 3.** Cortes transversais (Fig. 3A e 3B) e paradérmicos (Fig. 3C e 3D) de folíolos de *C. guianensis* em estágio de desenvolvimento E1 (Fig. 3A e 3C) e E6 (Fig. 3B e 3D). As siglas referem-se a: ep ad, epiderme adaxial; ep ab, epiderme abaxial; cep l, cera epicuticular lisa; e cep f, cera epicuticular floculada.



**Figura 4.** Posicionamento estomático em relação às células epidérmicas em folíolo de *C. guianensis* em E6. As siglas referem-se a: Pp, parênquima paliçádico; Epab, epiderme abaxial; CS, células subsidiárias; e ST, células guardas do estômato.

Os tricomas na epiderme adaxial são em maioria do tipo glandulares, solitários e multicelulares (formados por 10 a 12 células) nos estádios E1, E2 e E3. Para ilustração, foram selecionados tricomas de um folíolo em E3 como representativo desses estádios de desenvolvimento do folíolo (Figura 5A e 5B). No entanto, é possível ocorrer tricomas tectores, solitários e unicelulares nas superfícies adaxial e abaxial, como observado para um folíolo em E3 (Figura 5C).

Foi verificada maior frequência estomática na superfície abaxial do folíolo em todos os estádios de desenvolvimento, sendo possível inferir que houve um aumento na frequência estomática com o desenvolvimento dos folíolos (Tabela 1). Em contrapartida, para superfície adaxial, a ocorrência dos estômatos foi percebida somente a partir do estágio E4 (Tabela 1). Por outro lado, foi observada a ocorrência de tricomas em ambas as epidermes. Nessa análise foram computados os tricomas totais, sem fazer distinção entre tricomas glandulares e tectores. Maior frequência de tricomas foi observada nos estádios E1, E2 e E3 tanto na epiderme adaxial quanto abaxial (Tabela 1)



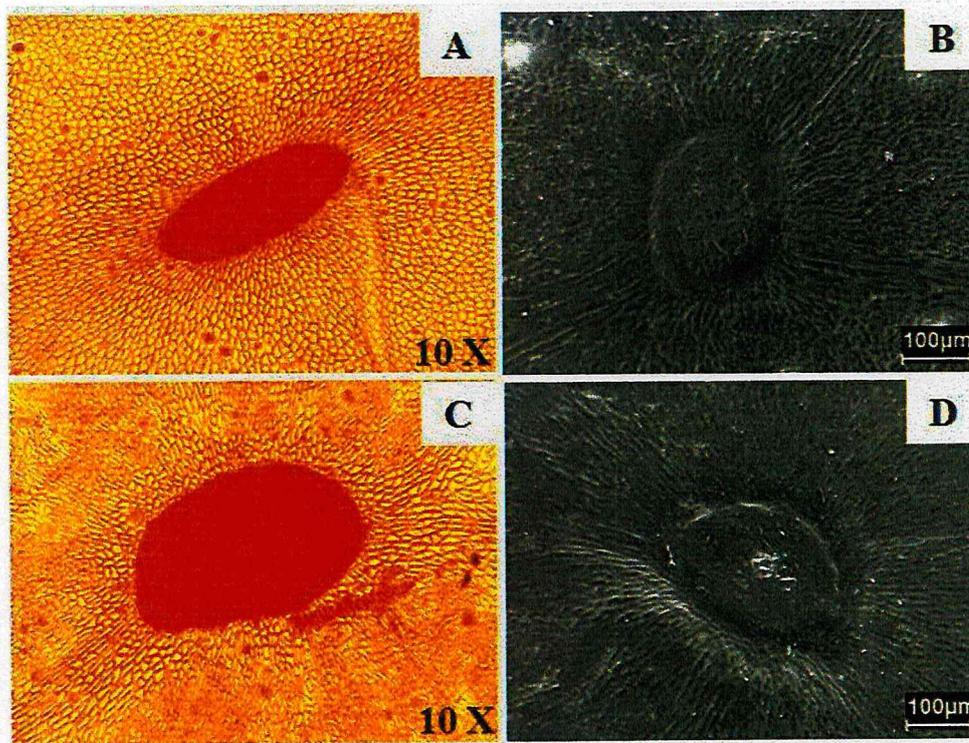
**Figura 5.** Visualização dos tricomas glandulares por meio de microscopia de luz (Fig. 5A) e MEV (Fig. 5B) e tricoma tector por MEV (Fig. 5C). As imagens são representativas de folíolo em E3.

**Tabela 1.** Variações na densidade estomática e de tricomas durante o desenvolvimento de folíolos de *Carapa guianensis*.

| Estádios | Densidade estomática<br>(n° estômatos mm <sup>-2</sup> ) |                     | Tricomas<br>(n° tricomas mm <sup>-2</sup> ) |                     |
|----------|--|---------------------|---|---------------------|
|          | Epiderme<br>Adaxial                                      | Epiderme<br>Abaxial | Epiderme<br>Adaxial                         | Epiderme<br>Abaxial |
| E1       | 0,00 ± 0,00  | 246,30 ± 3,60       | 2,03 ± 0,15                                 | 1,63 ± 0,32         |
| E2       | 0,00 ± 0,00  | 251,00 ± 5,86       | 1,15 ± 0,20                                 | 3,42 ± 0,16         |
| E3       | 0,00 ± 0,00  | 250,22 ± 2,62       | 2,75 ± 0,13                                 | 2,87 ± 0,24         |
| E4       | 0,48 ± 0,56  | 250,42 ± 4,17       | 1,57 ± 0,34                                 | 0,28 ± 0,13         |
| E5       | 0,73 ± 0,67  | 273,88 ± 5,48       | 1,38 ± 0,10                                 | 0,08 ± 0,03         |
| E6       | 0,55 ± 0,95  | 262,82 ± 7,53       | 1,58 ± 0,32                                 | 0,05 ± 0,05         |

Médias referentes a 270 visualizações por estágio foliar ± o desvio padrão.

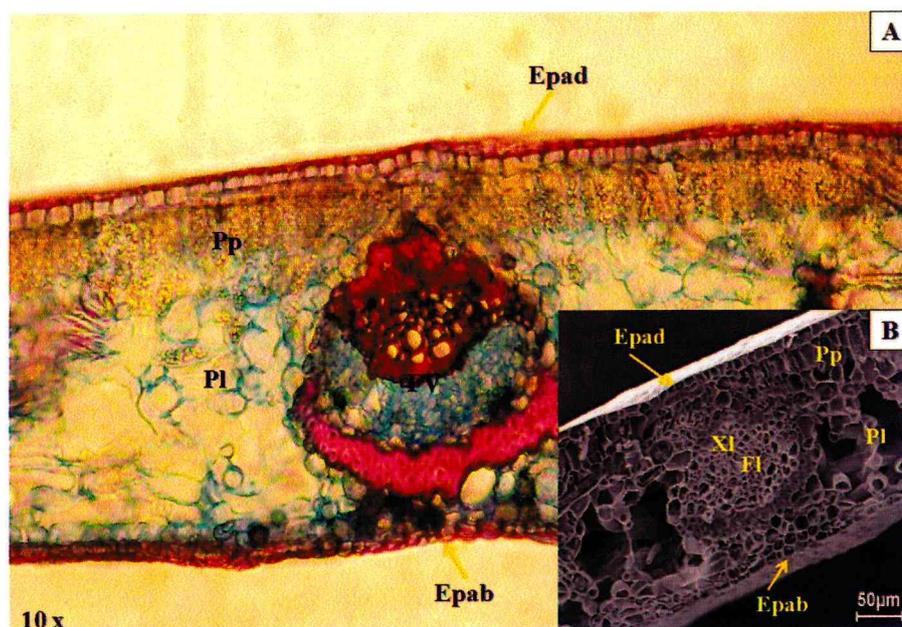
Foi observada a presença de nectários extraflorais (NEFs) em todos os estádios de desenvolvimento do folíolo, distribuídos aleatoriamente por todo o limbo foliolar, tanto na superfície adaxial (Figura 6D e 6F, respectivamente estádios E1 e E6) quanto na abaxial (Figura 6C e 6E, respectivamente estádios E1 e E6). As células que compõem esta estrutura epidérmica são justapostas, de formato irregular ou variando entre retangular, quadrangular e subtriangular (Figura 6C e 6E).



**Figura 6.** Visualização de nectários extraflorais em folíolos de *C. guianensis* em estágio E1 (Fig. 6A e 6B) e estágio E6 (Fig. 6C e 6D).

### 3.2. Mesofilo

Independente do estágio de desenvolvimento do folíolo, o mesofilo desta espécie é constituído de parênquima clorofiliano que se diferencia em paliádico e lacunoso, portanto, dorsiventral (Figura 7, representativa de folíolo em E6). O parênquima paliádico é geralmente uniestratificado, tendendo algumas vezes a ser biestratificado. As células são alongadas e justapostas, enquanto nas células do tecido lacunoso os espaços intercelulares são volumosos (Figura 7). Os feixes vasculares apresentam xilema voltado para a face superior e floema para a face inferior, feixes vasculares colaterais, limitados na porção superior e inferior por um conjunto de células esclerenquimáticas (Figura 7).



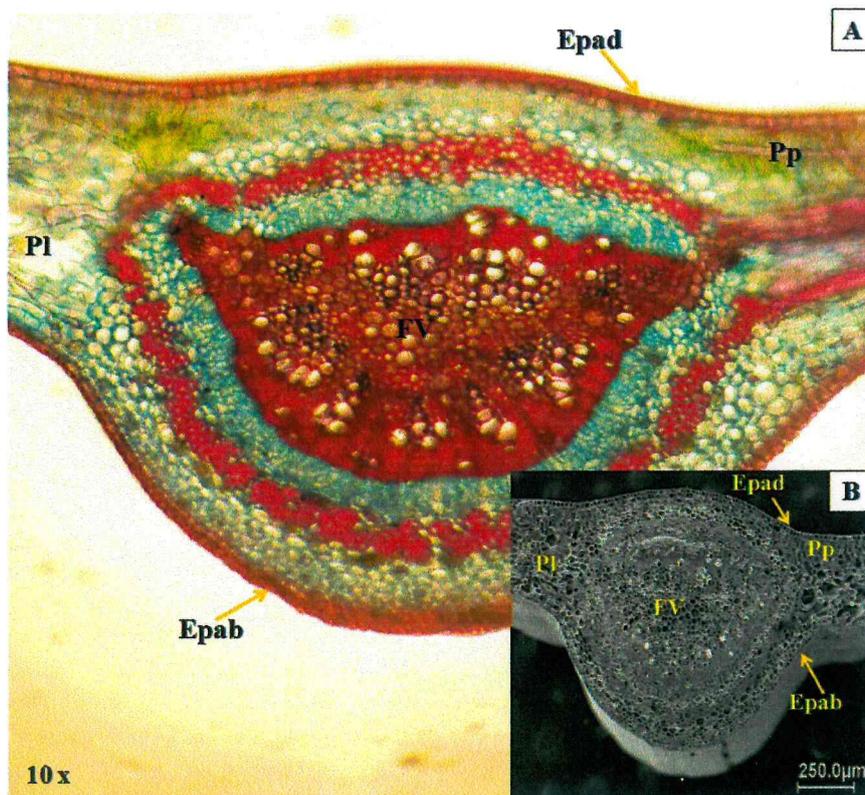
**Figura 7.** Imagens representativas da seção transversal do limbo foliar de *C. guianensis* por microscopia de luz (Fig. 7A) e MEV (Fig. 7B). As indicações EpAd, Epab, Pp, Pl, Fv, XI e Fl, referem-se respectivamente a epiderme adaxial, epiderme abaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, feixe vascular xilema e floema.

### 3.3. Nervura central

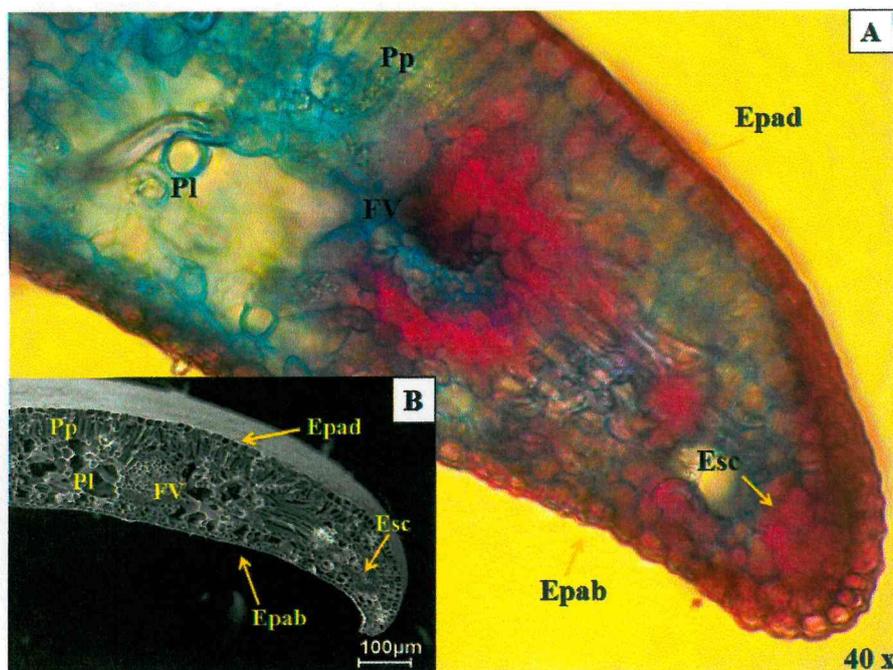
Independente do estágio de desenvolvimento do folíolo, a nervura central em seção transversal apresenta-se mais proeminente abaxialmente (Figura 8, representativo de folíolo em E6). As células epidérmicas são semelhantes às do limbo e sob a epiderme ocorrem células parenquimáticas de formato esferoidal. O tecido esclerenquimático circunda o feixe vascular central e o floema circunda as células do xilema, caracterizando um tecido vascular do tipo concêntrico anficrival, com medula formada por células parenquimáticas (Figura 8).

### 3.4. Margem

Independente do estágio de desenvolvimento do folíolo, a margem do folíolo é fletida em direção à face abaxial e do tipo revoluta, com células epidérmicas das extremidades na face superior ligeiramente mais alongadas em sentido vertical (Figura 9, representativa de folíolo em E6). Além disso, possuem cutículas mais espessas formando flanges esporádicos e apresenta denso esclerênquima localizado na extremidade do folíolo (Figura 9).



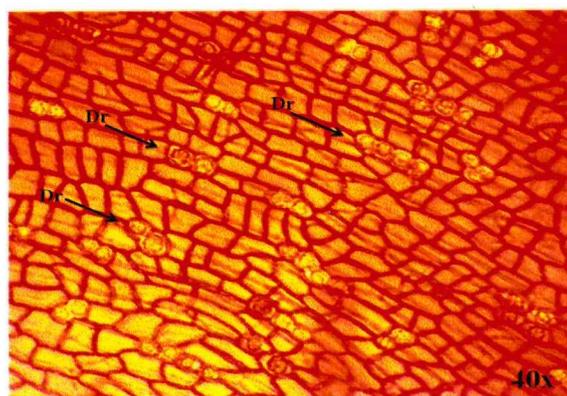
**Figura 8.** Imagens representativas da seção transversal da nervura central em folíolo de *C. guianensis* por microscopia de luz (Fig. 8A) e MEV (Fig. 8B). As indicações EpAd, Epab, Pp, Pl e FV, referem-se respectivamente a epiderme adaxial, epiderme abaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e feixe vascular.



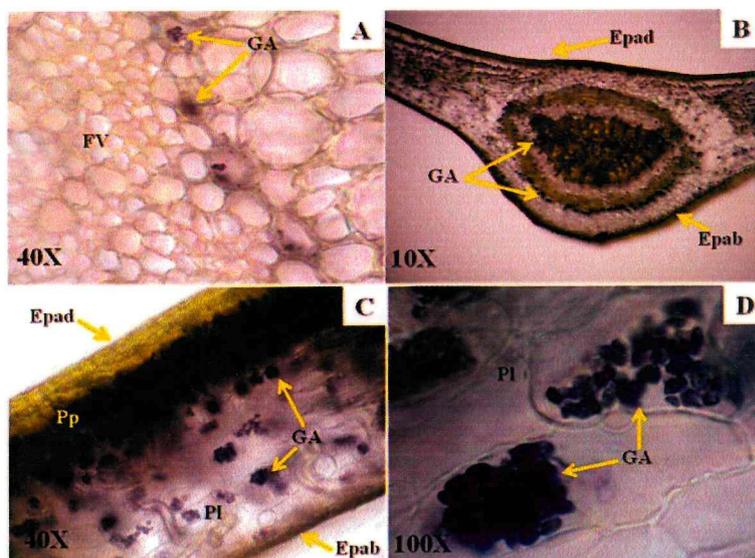
**Figura 9.** Imagens representativas da seção transversal da margem do folíolo de *C. guianensis* por microscopia de luz (Fig. 9A) e MEV (Fig. 9B). As indicações EpAd, Epab, Pp, Pl, Esc e FV, referem-se respectivamente a epiderme adaxial, epiderme abaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, esclerênquima e feixe vascular.

### 3.5. Testes microquímicos

Houve presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas em ambas as superfícies do folíolo e em todos os estádios de desenvolvimento. Entretanto, essas drusas foram encontradas em maior freqüência nas nervuras centrais e secundárias, apresentando-se sempre em seqüências de dois a seis cristais (Figura 10). Em alguns casos, as drusas podem ocorrer isoladamente na face adaxial, dispersas no limbo foliolar (dado não mostrado). Foi constatada a presença de bainha amilífera nos feixes vasculares de todos os estádios de desenvolvimento dos folíolos e praticamente em todos os tecidos do limbo foliolar (Figura 11). No entanto, o acúmulo de amido quanto mais maduro era o folíolo, como no estágio E6, por exemplo (Figura 11C e 11D).



**Figura 10.** Visualização de drusas (Dr) na nervura central da epiderme abaxial de folíolo de *C. guianensis* em estágio E6.



**Figura 11.** Visualização de grãos de amido em folíolos de *C. guianensis* em estádios E1 (Fig. 11A), E3 (Fig. 11B) e E6 (Fig. 11C e 11D). As indicações Pp, Pl, Epad, Epab, FV e GA referem-se, respectivamente, ao parênquima paliádico, parênquima lacunoso, Epiderme adaxial, Epiderme abaxial, Feixe Vascular e grãos de amido.

#### 4. DISCUSSÃO

Fatores ambientais influenciam características morfológicas, fisiológicas e anatômicas das plantas, podendo exercer papel fundamental no estabelecimento das diferentes espécies vegetais. As folhas são os órgãos vegetais responsáveis pelas trocas gasosas das plantas vasculares, estando mais expostas a ação do ambiente que as circunda. Devido a isto, as folhas se adaptam às mudanças nas condições ambientais (COSTA, 1982; FAHN, 1986).

A epiderme revela-se de grande valor, não só pela forma e grandeza das suas células, mas particularmente pelos outros elementos ali encontrados, de estruturas muito variadas, em particular os estômatos, tricomas e glândulas externas (COSTA, 1982).

Do ponto de vista fisiológico, a anatomia foliar comparada em espécies de *Oenocarpus* (Mart) evidencia uma cobertura de cera, dentre outros fatores, que confere resistência à difusão do vapor d'água do mesófilo para o ambiente externo, atuando no controle da transpiração exercida pela cutícula (SILVA; POTIGUARA, 2008). Por outro lado, Cutter (2002) assinala que os depósitos de cera epicuticular parecem não desempenhar papel importante na redução da transpiração, mas afetam o grau de umidade da superfície epidérmica. A camada de cera epicuticular observada nas superfícies dos folíolos de *C.guianensis* é lisa, podendo estar relacionada à resistência ao fluxo de vapor d'água via transpiração e desidratação dos folíolos.

Metcalf e Chalk (1983) constataram que na maioria das espécies de ambiente xérico ou em folhas de sol, a cutícula apresenta-se estriada, enquanto nas espécies mesófitas, hidrófitas ou em folhas de sombra, a cutícula apresentava-se lisa.

Os parâmetros morfológicos dos estômatos, tais como tamanho, frequência e distribuição variam enormemente dentre espécies arbóreas de um mesmo ambiente (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003) e entre ambientes diferentes (PANDEY; NAGAR 2003; PEARCE et al., 2006). Isto sugere que as plantas possuem a capacidade de ajustar estas características em resposta às pressões ambientais presentes no momento em que a folha está em formação (ABRAMS et al., 1994).

Os estômatos são poros pequenos, podendo estar situados tanto na superfície adaxial quanto abaxial da lâmina foliar. Seu mecanismo de abertura e fechamento está sob controle das células-guardas. Quando abertos, favorecem o influxo de CO<sub>2</sub> na folha o qual será utilizado para a formação de trioses-P, bem como permitem a saída de H<sub>2</sub>O na forma de vapor via transpiração.

Folhas anfiestomáticas e hipoestomáticas são características de plantas que crescem em ambientes mesofíticos (CUTTER, 2002), o qual, segundo Esau (1985), proporciona maior frequência estomática na face abaxial, como verificado em *C. guianensis*, que é anfiestomática com maior ocorrência na epiderme inferior. Quanto mais estômatos existirem por unidade de área, mais CO<sub>2</sub> é potencialmente absorvido, conseqüentemente mais água é perdida para a atmosfera.

Segundo Mauser (1988), a menor frequência estomática na epiderme adaxial deve-se ao fato da exposição desta aos raios solares incidentes, os quais favoreceriam sobretudo a transpiração. Portanto, a concentração de estômatos na epiderme abaxial é uma estratégia de minimização de transpiração, como aquela observada nos folíolos de *C. guianensis* independente do estágio de desenvolvimento.

A menor frequência de estômatos foi verificada na epiderme adaxial e maior na epiderme abaxial. Conforme demonstrado, essa frequência estomática foi substancialmente maior nos folíolos em estágio E5 e E6 (epiderme abaxial), corroborando com os valores obtidos também para transpiração e condutância estomática nestes mesmos estágios de desenvolvimento (CAPÍTULO II, Fig. 2B e 2C).

Vários são os fatores anatômicos e morfológicos da folha que podem influenciar a camada de ar limítrofe, entre eles os tricomas (TAIZ E ZEIGHER, 2009). Estes servem como quebra-ventos microscópicos, interferindo diretamente no processo de transpiração foliar.

Qualquer apêndice epidérmico, seja este uni ou multicelular, recebe a designação de tricoma (FAHN, 1990). Geralmente são estruturas simples, que têm uma grande variação quanto à forma, ao tamanho, ao conteúdo e, principalmente, à função (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003). Podem ser classificados como glandulares, que possuem função secretora e ou armazenadora; e de revestimento, os tectores (CUTTER, 1986; ESAU, 1997).

Dimock & Kennedy (1983) verificaram que os tricomas glandulares podem sintetizar substâncias especializadas, como alguns metabólitos secundários, em particular os de características voláteis. Em tomateiros, os tricomas apresentam não somente a função secretora de exsudados químicos, mas também constituem a base mecânica da resistência a diferentes insetos. Ademais, tricomas podem conferir proteção mecânica e evitar excesso de transpiração, uma vez que diminuem o movimento das correntes de ar na superfície foliar (DUARTE; LOPES, 2004), bem

como desempenha papel de defesa, criando uma barreira mecânica contra ovoposição e a nutrição de larvas e insetos (CUTTER, 1986).

Ao comparar a estrutura e composição foliar de espécies vegetais do hemisfério norte, Valkama et al. (2003) observaram que os tricomas tectores servem de barreira mecânica contra herbívoros e patógenos, radiação ultravioleta, calor extremo e perda excessiva de água. Em contrapartida, os tricomas glandulares estão envolvidos na proteção química, através da liberação de substâncias como lipídios, terpenos e fenóis, os quais tem ação antimicrobiana.

Foi verificada a presença de tricomas tectores e glandulares nos folíolos dos diferentes estádios de desenvolvimento. Em alguns estádios foliolares (E1, E2 e E3) foram observados tricomas glandulares, e nos demais estádios (E4, E5 e E6) somente bases de tricomas; pois são efêmeros.

Os nectários extraflorais (NEFs) podem ser definidos como glândulas que produzem uma secreção na qual predominam açúcares e são encontrados nos órgãos vegetativos (PAIVA; MACHADO, 2006). O néctar secretado pode conter glicose, frutose e sacarose, nas mais variadas concentrações, e em alguns casos podem conter ainda rafinose, melobiose, mucilagem, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, íons, fosfatose, vitaminas e compostos fenólicos (FANH, 1986).

Em *Cedrella fissilis*, os nectários extraflorais encontram-se predominantemente na superfície inferior dos folíolos, o que seria um padrão de distribuição também observado para outras espécies de meliáceas (PAIVA; BUONO; DELGADO, 2007). Em *C. guianensis*, os nectários extraflorais foram evidenciados em todos os estádios de desenvolvimento do folíolo, tanto na superfície adaxial quanto na abaxial, porém em diferentes frequências.

Todos os estádios de desenvolvimento dos folíolos de *C. guianensis* mostraram uma simetria dorsiventral, em que o xilema está voltado para a face adaxial enquanto o floema está para a face abaxial. Parênquima paliçádico com apenas uma camada de células e um parênquima lacunoso mais abundante em todos os estádios de desenvolvimento. Cutter (2002) cita que independente da diferenciação, o mesófilo pode ser utilizado como um critério a mais na identificação de espécies. O referido autor considera, também, que as variações ambientais não alterarão os arranjos celulares deste tecido, uma vez que são controlados pela informação genética presente no genoma. A distribuição e a forma das células mesofílicas, assim como a presença ou ausência de

espaços intercelulares podem ser utilizadas como características de diagnóstico. Sabe-se, entretanto, que a quantidade de tecido fundamental do mesofilo, a altura do parênquima paliçádico e a compactação do parênquima lacunoso não são úteis para fins de diagnóstico, uma vez que sofrem influências de fatores ambientais tais como intensidade luminosa, disponibilidade de água do solo, umidade atmosférica e posição da folha na planta conforme consideram Esau (1986).

Os cristais de oxalato de cálcio são comuns nas células vegetais de vários órgãos (Mauseth 1988, Fahn 1990) e têm como principal função remover o excesso de cálcio do sistema. Outras funções comumente associadas à presença destes cristais são: defesa da planta contra a herbivoria e estratégia de manutenção de nutrientes, como reserva de cálcio ou oxalato para a planta. Uma vez que foram observados vários oxalatos de cálcio na forma de drusas, pode-se inferir que a *C. guianensis* apresenta eficiente mecanismo de controle do cálcio intracelular em todos os estádios de desenvolvimento do folíolo.

As substâncias ergásticas, ou seja, produtos do metabolismo vegetal primário ou secundário possuem grande valor taxonômico e filogenético em vários grupos vegetais (SILVA; POTIGUARA, 2009). O amido foi detectado em todos os estádios de desenvolvimento, no entanto, com o desenvolvimento dos folíolos, a concentração de amido foi maior. Este resultado confirma a maior concentração de amido em folíolos maduros obtidos espectrofotometricamente no CAPÍTULO I (Figura 6, página 33) desta dissertação.

## 5. CONCLUSÃO

Pequenas diferenças qualitativas foram constatadas nas estruturas anatômicas em função do desenvolvimento dos folíolos de *C. guianensis*. Isto significa que os tipos de tecidos e estruturas (camada de cera epicuticular, epiderme, parênquimas, estômatos, nectários extraflorais e cristais) evidenciadas nos folíolos apresentaram características semelhantes independente do estágio de desenvolvimento.

Diferenças quantitativas entre folíolos foram observadas com relação à frequência de estômatos e tricomas e nos tipos de tricomas observados. Diferença marcante entre folíolos de diferentes estádios de desenvolvimento foi evidenciada com relação à sua capacidade de armazenamento do amido, a qual aumentou progressivamente do E1 ao E6. Esse amido foi armazenado em bainha amilífera nos estádios mais juvenis e por todo o parênquima em folíolos maduros (E5 e E6).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, M. D.; KUBISKE, M. E.; MOSTOLLER, S. A. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. **Ecology**, v. 75, p. 123-133, 1994.

BASTOS, E. A., RODRIGUES, B. H. N., ANDRADE JÚNIOR, A. S., CARDOSO, M. J. Parâmetros de crescimento do feijão caupi sob diferentes regimes hídricos. **Engenharia Agrícola**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 43-50, 2002.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.26, n.1, p.61-72, 2003.

BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da campina. **Acta Amazonica**, v.7 (3): 30-36. 1977.

CAVALCANTE, F. J. B.; FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. C. & SILVA, M. F. Pesquisa e identificação de espécies oleaginosas nativas da Amazônia. **Relatório Técnico**. Convênio Codeama/INPA, Manaus, Amazonas. 1986.

COSTA, A. F. Farmacognosia. **Fundação Calouste Gulbenkain**. Lisboa, 2 ed. v 3, 1117p. 1982

CUTTER, E.G. Anatomia vegetal. Parte I – Células e tecidos. 2 ed. São Paulo, Roca; 1986.

CUTTER, E. G. Anatomia vegetal: Parte I - Células e tecidos. 2º ed. Botucatu: Roca, 304 p, 2002.

DIMOCK, M.B.; KENNEDY, G. G. The role of glandular trichomes in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *Heliothis zea*. **Entomol. Exp. Appl.** v. 33, p.263-268. 1983.

DUARTE, M. R.; LOPES, J. F. Análise fotônica e ultra-estrutural da epiderme foliar de *Galinsoga parviflora* cav. E g. *Ciliata* (raf.) Blake, asteraceae. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 41-46, Jan.- Jun./2004

ESAU, K. *Plant anatomy*. 2º ed. Tokyo: Toppan Company, 767p. 1986.

ESAU, K. *Anatomia das plantas com sementes*. Ed. Edgard Blucher: São Paulo, 293p. 1997.

FAHN, A. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Annals of Botany* 57: 631-637, 1986.

FAHN, A. *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon, 544 p, 1990.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*carapa guianensis* aubl. e *carapa procera* d. c.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazônica*, v. 32, p. 647-661, 2002.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw-Hill Book Co. 523p. 1940.

KRAUS, J. E; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Ed. Universidade Rural, 1997.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody plants**. 2 ed. Academic press limited, 1997.

MAUSETH, J. D. *Plant anatomy*. Menlo Park: Benjamin Cummings, 568 p, 1988.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, v. 2, p. 1346-1348. 1950.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons - Wood structure and conclusion of the general introduction**. 2º ed. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 308p. 1983.

PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). **Acta bot. bras.** 20(2): 471-482. 2006.

PAIVA, A. S.; BUONO, R. A.; DELGADO, M. N. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Flora** v.202, p.455–461, 2007.

PANDEY, S.; NAGAR, P. K. Patterns of leaf surface wetness in some important medicinal and aromatic plants of Western Himalaya. **Flora** 198: 349-357. 2003.

PEARCE, D. W.; MILLARD, S.; BRAY, D .F.; ROOD, S. B. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. **Tree Physiology** 26: 211-218. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Artemed, 2009. 819p.

SHANLEY, P; MEDINA, G. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. CIFOR - Imazon, Belém , p. 87-90, 1998.

SILVA, R. J. F.; POTIGUARA, R. C. V. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). **Acta bot. bras.** 22(4): 999-1014. 2008

SILVA, E. S; NISHIOKA, T. D. Extração e caracterização físico-química do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) por prensa, solvente e método artesanal. 2007. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, 2007.

VALKAMA, E.; SALMINEN, J. P.; KORICHEVA, J.; PIHLAJA, K. Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. *Annals of Botany, London*, v. 91, n. 6, p. 643- 655, 2003.