

## Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado

Castro, A.H.F.<sup>1</sup>, Alvarenga, A.A.<sup>2</sup>, Soares, A.M.<sup>2</sup>, Young, M.C.M.<sup>3</sup>, Purcino, A.A.C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Lavras, R. Padre José Poggel, 506, 37200-000, Lavras, MG; <sup>2</sup>UFLA, C.P.37, 37200-000, Lavras, MG; <sup>3</sup>Instituto de Botânica/SP, C.P. 4005, 01061-970, São Paulo, SP; <sup>4</sup>EMBRAPA Milho e Sorgo, Rod. MG 424, Km 65, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

**RESUMO:** Com o objetivo de investigar a influência de variações sazonais do ambiente físico, no estado hídrico foliar, nas trocas gasosas, na atividade da fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais em murici, um experimento foi conduzido, a uma frequência mensal, em área de formação campestre, com fisionomia de Cerrado *sensu strictu*, localizada no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, entre os meses de novembro de 2001 a setembro de 2002. Para as avaliações selecionaram-se plantas com altura média de  $2,70 \pm 0,21$  m e diâmetro basal médio de  $0,15 \pm 0,04$  m. Os resultados obtidos demonstraram que o potencial hídrico foliar não apresentou variações sazonais significativas, indicando que as plantas encontravam-se em condições hídricas similares, nas estações seca e chuvosa. Em geral, as maiores taxas fotossintética e transpiratória foram observadas na estação chuvosa. A fotossíntese líquida mostrou-se mais elevada pela manhã, não se observando, entretanto, variações significativas na transpiração entre os horários de avaliação. A condutância estomática atingiu valores próximos em ambas às estações, sugerindo a participação de fatores não estomáticos nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas. Variações sazonais significativas na atividade enzimática e nos teores de taninos totais foram observados, sendo os incrementos na atividade enzimática e os declínios nos teores de taninos totais característicos da estação seca. Os níveis de fenóis totais não variaram significativamente entre as estações seca e chuvosa. Os teores de taninos totais acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, enquanto que a atividade enzimática mostrou-se mais influenciada pelas condições ambientais.

**Palavras-Chave:** murici, Cerrado, tanino, fenilalanina amônia-liase, sazonalidade

**ABSTRACT:** Seasonal evaluation of phenylalanine ammonia-lyase activity and total phenolic and tannin contents of *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: a medicinal plant of Brazilian Cerrado. An experiment was conducted, ever month, from november, 2001 to september, 2002 in order to investigate the influence of seasonal variation of physical environment on gas exchange, on leaf water state, on the phenylalanine ammonia-lyase activity and on the total phenolic and tannin contents of murici. The used area was a prairie with a physiomy of Cerrado *stricto sensu*, located in Ijaci, south of the State of Minas Gerais. For the evaluation, plants were selected with an average height of  $2.70 \pm 0.21$  m and an average basal diameter of  $0.15 \pm 0.04$  m. Leaf potential at 7 and 12 am and gas exchange at 10 and 12 am was evaluated ever month. The results showed that the leaf water potential was not significant seasonal variations indicating that the plants were in similar water conditions in both dry and rainy seasons. Higher photosynthetic and transpiration rates were observed during rainy season. The net photosynthesis showed higher in the morning, although no significant variations of transpiration on the evaluating hours were observed. The stomatal conductance reached similar values in both seasons, suggesting a participation of non-stomatal factors on the seasonal variation observed for the gas exchange. It was also observed significant seasonal variations on enzyme activity and total tannins contents. The increase of the phenylalanine ammonia-lyase activity and decrease of the total tannins contents were characteristic of the dry season. The levels of total phenolics had not varied significantly during the dry and rainy seasons, while the total tannin contents followed the photosynthetic response of plants, the enzyme activity was much more influenced by environmental conditions.

**Key words:** murici, Brazilian Cerrado, tannin, phenylalanine ammonia-lyase, seasonality.

Recebido para publicação em 10/02/2004

Aceito para publicação em 26/01/2005

## INTRODUÇÃO

O ambiente físico desempenha um papel considerável no crescimento, desenvolvimento e na produtividade das plantas, promovendo alterações físicas e químicas no metabolismo vegetal (Janas *et al.*, 2000). Abrams & Mostoller (1995) sugerem que as plantas exibem variações não genéticas em sua morfologia e fisiologia, em resposta à variação ambiental. Esse fenômeno, conhecido como plasticidade fenotípica é responsável pelos diferentes padrões de crescimento e desenvolvimento das espécies que vivem em diferentes ecossistemas.

O Cerrado brasileiro concentra sobre a sua superfície uma fonte inestimável de recursos biológicos, pouco explorada e de elevado potencial econômico, com um grande número de espécies medicinais, frutíferas, ornamentais e fornecedoras de madeira (Almeida *et al.*, 1998). Segundo Sarmiento (1983), as comunidades do Cerrado são complexas e entre os principais fatores que influenciam a estrutura desta vegetação incluem-se o fogo, o baixo nível de nutrientes, alta demanda evaporativa e temperatura e a pronunciada sazonalidade de precipitação (Pivello & Coutinho, 1992). Para Adámoli *et al.* (1986), as variações climáticas, caracterizadas principalmente pela distinção entre uma estação seca (abril a setembro) e outra chuvosa (outubro a março), representam a principal limitação ambiental do Cerrado. Entretanto, segundo Meinzer *et al.* (1999), o padrão de comportamento das espécies do Cerrado é dependente de uma interação entre fatores edafoclimáticos e de características peculiares desta vegetação.

O monitoramento periódico das variações sazonais e diurnas do *status* hídrico e das trocas gasosas, quando associado a medições da condutância estomática e de variações de características ambientais e edáficas, constituem em uma importante ferramenta para se compreender como determinada espécie ou genótipo utiliza os recursos disponíveis do ambiente e como flutuações sazonais destes recursos afetam a produtividade primária (Roberts *et al.*, 1992).

Além dos metabólitos primários, uma grande variedade de metabólitos secundários é sintetizada ao longo do biociclo vegetal, para os quais muitas funções ecológicas, fisiológicas e curativas têm sido atribuídas (Kouki & Manetas, 2002). Segundo Santos e Palazzo de Melo (2000), os taninos são substâncias polifenólicas de alto peso molecular e sabor adstringente, encontrados no interior dos vacúolos vegetais. Além de sua larga utilização nas indústrias de curtume, tradicionalmente são também empregados na medicina popular, devido a sua ação adstringente (Haslam, 1996). De acordo com De Bruyne *et al.* (1999), os taninos, assim como os demais compostos fenólicos, derivam-se de um

intermediário biossintético comum, a fenilalanina, ou de seu precursor, o ácido chiquímico, sintetizados através da Rota do Chiquimato.

A fenilalanina amônia-liase destaca-se como uma enzima chave e regulatória da rota de biossíntese dos fenilpropanóides e seus derivados, catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, sendo este o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos vegetais (Cheng *et al.*, 2001).

Do ponto de vista fisiológico, os taninos são considerados metabólitos secundários, originados diretamente do metabolismo do carbono (Koricheva *et al.*, 1998; Heyworth *et al.*, 1998). Nas plantas, a alocação de carbono para a síntese de metabólitos secundários é determinada tanto pela disponibilidade de recursos edafoclimáticos (água, nutrientes, luz, concentração de CO<sub>2</sub>), como por estresses específicos (seca, poluentes atmosféricos, radiação ultra-violeta, temperatura) (Koricheva *et al.*, 1998; Lavola, 1998; Kouki & Manetas, 2002). Assim, vários fatores que afetam o crescimento, fotossíntese e outros aspectos do metabolismo primário, também causam efeitos no metabolismo secundário (Lavola *et al.*, 2000). Entretanto, segundo Lavola (1998), deve-se considerar que quando associados, estes fatores podem afetar diferentemente os padrões morfológicos e bioquímicos das plantas.

De acordo com Kouki & Manetas (2002), a disponibilidade de recursos também promove efeitos regulatórios na atividade de enzimas chaves da rota biossintética destes metabólitos. Janas *et al.* (2000) ressaltam que a atividade da fenilalanina amônia-liase e o acúmulo de fenólicos ocorrem como consequência de estresses bióticos, como infecção por microorganismos, ataque de insetos e herbívoros (Rivero *et al.*, 2001) e estresses abióticos como temperatura (Solecka *et al.*, 1999; Janas *et al.*, 2000), luz (Lavola *et al.*, 2000), disponibilidade de água (Chakraborty *et al.*, 2001), ferimentos (Saltveit, 2000) e níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico (Hartley *et al.*, 2000; Assis *et al.*, 2001). Solecka & Kacperska (1995) relatam que estes estresses podem modificar tanto a síntese da enzima, como a sua atividade, em uma ampla variedade de plantas.

O murici destaca-se como uma espécie medicinal e frutífera, de ampla distribuição no Cerrado brasileiro. Popularmente, sua casca, rica em taninos, é muito utilizada como cicatrizante e antiinflamatória, devido à sua elevada adstringência (Rodrigues & Carvalho, 2001). Apesar de sua importância econômica, é pouco estudada, principalmente, em relação ao seu comportamento fisiológico e químico diante de variações no ambiente físico em que se desenvolve.

Pesquisas que investiguem o comportamento das espécies medicinais e a

produção de princípios ativos vegetais, em relação a diferentes fatores ambientais, podem indicar condições adequadas de manejo que otimizem suas produções, proporcionando uma exploração mais racional do potencial medicinal dessas espécies. Neste contexto, este trabalho teve como propósitos principais investigar a influência das variações sazonais do ambiente físico nas trocas gasosas, nas relações hídricas desta espécie e na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais, em condições naturais.

## MATERIAL E MÉTODO

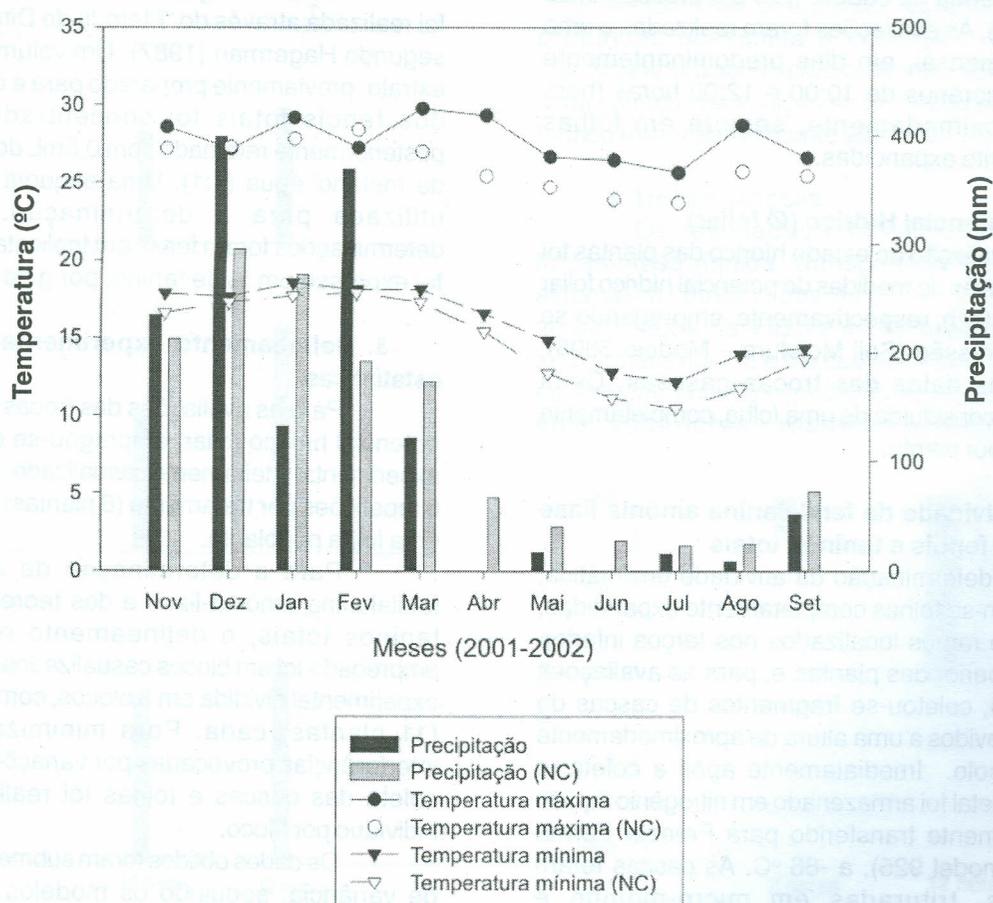
### 1. Condições experimentais

O estudo foi conduzido de novembro de 2001 a de setembro de 2002, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, situado ao sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00' W GRW. A temperatura média anual do ar dessa região é 19,4°C e as médias anuais de temperatura do ar máxima e mínima são, respectivamente, 26,1°C e 14,8°C, com precipitação

anual de 1529,7 mm (Brasil, 1992). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, apresentando duas estações bem definidas: seca, de abril a setembro e chuvosa, de outubro a março. A Figura 1 apresenta os valores médios mensais das temperaturas máxima e mínima e precipitação, referentes ao período experimental, coletados na Estação Climatológica Principal de Lavras, situada a 10 Km da área experimental.

De maneira geral, o período experimental foi caracterizado por condições de temperaturas máxima e mínima acima das normais climatológicas para a região (Brasil, 1992). Com exceção dos meses de dezembro de 2001 e fevereiro de 2002, os demais meses apresentaram-se mais quentes, com elevações médias de 1 a 2°C na temperatura. Precipitações mais elevadas foram verificadas nos meses de dezembro e fevereiro, sendo estas 26% e 48% superiores àquelas esperadas para o período, enquanto que os meses de abril a setembro mostraram-se mais secos, com baixos índices pluviométricos.

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, muito argiloso, relevo



**FIGURA 1.** Valores mensais médios de temperaturas máxima e mínima e precipitação mensal (mm), durante o período experimental e normais climatológicas (NC) observadas de 1965-1990. UFLA. Lavras, MG, 2002.

ondulado fase cerrado.

A espécie estudada foi o murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss), pertencente à família Malpigiaceae. Uma excisada da espécie estudada encontra-se depositada no Herbário da ESAL/Lavras e registrada sob o número 17.228. Para as avaliações foram selecionadas plantas, com altura média  $2,70 \pm 0,21$  m e diâmetro basal médio de  $0,15 \pm 0,04$  m, medido a 5 cm do solo.

## 2. Características avaliadas

### 2.1. Trocas Gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas utilizando-se analisador portátil de  $\text{CO}_2$  infravermelho (IRGA), modelo ADC-LCA-4 (Hoddesdon, UK). Foram avaliadas as seguintes características: fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), temperatura da folha (Tf) e da cubeta (T), umidade relativa (UR). A partir dos dados de umidade relativa e temperatura da cubeta, foram obtidos os valores do déficit de pressão de vapor (DPV) da cubeta, que representa a diferença entre a pressão de saturação de vapor de água na cubeta ( $E_s$ ) e a pressão atual de vapor ( $E_a$ ). As avaliações foram realizadas a uma frequência mensal, em dias predominantemente claros, nos horários de 10:00 e 12:00 horas (hora solar), aproximadamente, sempre em folhas completamente expandidas.

### 2.2. Potencial Hídrico ( $\Phi$ foliar)

A avaliação do estado hídrico das plantas foi realizada através de medidas do potencial hídrico foliar às 7:00 e 12:00 h, respectivamente, empregando-se bomba de pressão (Soil Moisture – Modelo 3005), nas mesmas datas das trocas gasosas. Cada repetição foi constituída de uma folha, completamente expandida, por planta.

### 2.3 Atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais

Na determinação da atividade enzimática, empregaram-se folhas completamente expandidas, retiradas de ramos localizados nos terços inferior, médio e superior das plantas e, para as avaliações fitoquímicas, coletou-se fragmentos de cascas do tronco, removidos a uma altura de aproximadamente 50 cm do solo. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi armazenado em nitrogênio líquido e posteriormente transferido para Freezer Forma Scientific (model 925), a  $-86^\circ\text{C}$ . As cascas foram liofilizadas, trituradas em micro-moinho e armazenadas em frascos fechados e protegidos da luz.

### a) Fenilalanina amônia-liase

O procedimento descrito por Assis *et al.* (2001), com algumas modificações foi utilizado para extração e determinação da atividade enzimática.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela produção de cinamato, após 90 minutos, a  $30^\circ\text{C}$ , sob agitação contínua, medida pela variação da absorbância a 290 nm. A atividade da enzima foi determinada em  $\text{mmol de ácido cinâmico} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de folha fresca. As análises foram realizadas em triplicata.

### b) Fenóis Totais

Aproximadamente 500 mg de casca liofilizada e triturada foi extraída cinco vezes com 5 mL de uma mistura de metanol: água (1:1), sob refluxo. O volume final foi completado para 25 mL. Uma alíquota de 100 mL do extrato foi utilizada para a determinação dos teores de fenóis totais, através do método de Folin-Dennis (AOAC, 1970). As determinações foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em % de ácido tânico, por g de casca seca.

### c) Taninos Totais

A determinação dos teores de taninos totais foi realizada através do "Método de Difusão Radial", segundo Hagerman (1987). Um volume de 5 mL do extrato, previamente preparado para a determinação dos fenóis totais foi concentrado a  $37^\circ\text{C}$  e posteriormente retomado com 0,5 mL de uma mistura de metanol: água (1:1). Uma alíquota de 15 mL foi utilizada para a determinação. Todas as determinações foram feitas em triplicata. O resultado foi expresso em % de tanino, por g de casca seca.

## 3. Delineamento experimental e análises estatísticas

Para as avaliações das trocas gasosas e do potencial hídrico foliar, empregou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de 6 repetições por tratamento (6 plantas), utilizando-se uma folha por planta.

Para a determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais, o delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados, sendo a área experimental dividida em 3 blocos, com 11 indivíduos (11 plantas) cada. Para minimizar possíveis interferências provocadas por variações edáficas, a coleta das cascas e folhas foi realizada em um indivíduo por bloco.

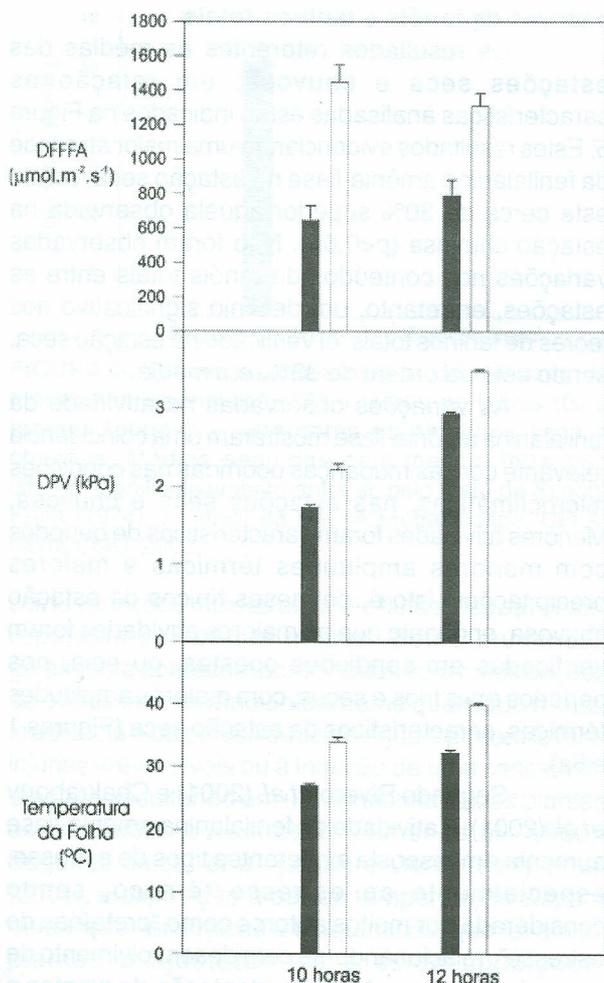
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguindo os modelos matemáticos próprios para os delineamentos utilizados e analisados estatisticamente, utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Ferreira,

2000). Para comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos utilizou-se Teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### 1. O Microclima

A Figura 2 apresenta os valores de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, déficit de pressão de vapor e temperatura da folha, correspondentes às médias para as estações chuvosa e seca, observadas as 10 e 12 horas, durante o período experimental. Maiores valores de DFFFA, DPV e temperatura da folha ocorreram na estação chuvosa, sendo estes 51%, 38% e 19% superiores àquelas da estação seca, respectivamente. Aumentos no DPV e na temperatura foliar foram observados ao meio dia ( $p < 0,05$ ), em ambas as estações, enquanto que a DFFFA não apresentou variações significativas entre os horários de avaliação, possivelmente devido às características dos estratos arbóreos que compõem a área em estudo, tornando-a mais



**FIGURA 2.** Valores médios da DFFFA, DPV e temperatura da folha nas estações seca (■) e chuvosa (□), às 10:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média  $\pm$  o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

sombreada.

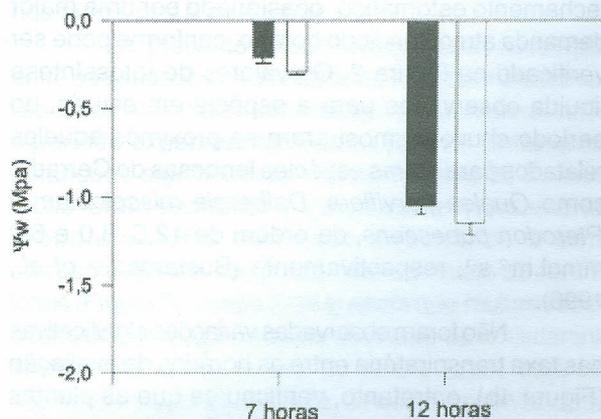
### 2. Potencial hídrico foliar

Os valores de potencial hídrico não variaram significativamente entre as estações seca e chuvosa, indicando que as plantas se encontravam em condições hídricas similares (Figura 3). Estes resultados refletem a alta disponibilidade hídrica das camadas mais profundas do solo e reforçam as observações de Medina & Francisco (1994) e Franco (1998), de que os solos sob Cerrado conservam-se, em geral, úmidos durante todo o ano, mesmo nos períodos de seca mais intensa. Segundo Matos *et al.* (1997), em geral, as árvores e arbustos do Cerrado apresentam potencial hídrico ao amanhecer entre -0,1 e -0,3 MPa, na estação chuvosa e -0,3 e -0,8 MPa, na estação seca e potencial hídrico mínimo ao meio dia, geralmente alcançando valores de -1,0 a -3,0 MPa, na estação chuvosa e -2,0 a -4,0 MPa, na estação seca.

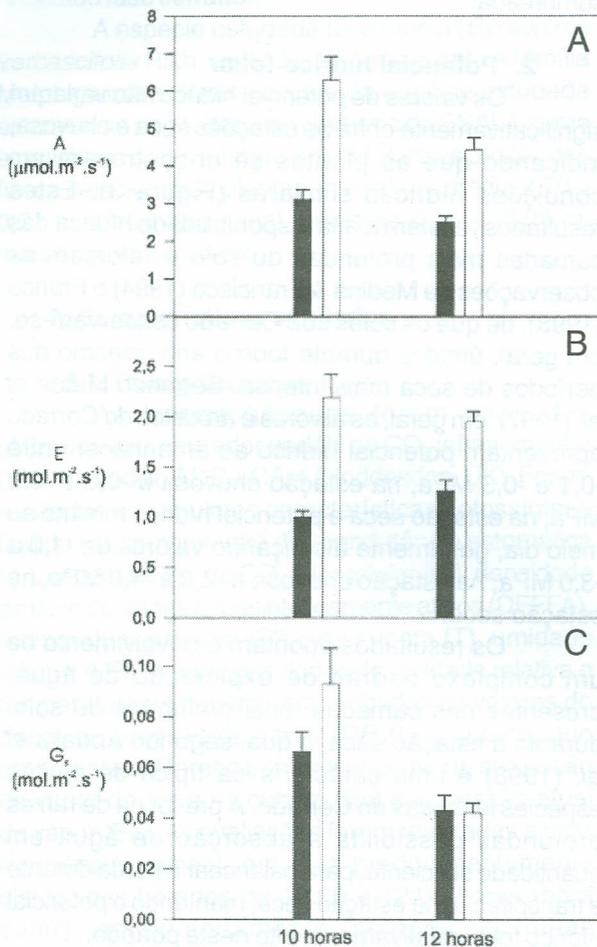
Os resultados apontam o envolvimento de um complexo padrão de exploração de água, presentes nas camadas mais profundas do solo, durante a estação seca, o que, segundo Abdalla *et al.* (1998) é uma característica típica de muitas espécies lenhosas do Cerrado. A presença de raízes profundas possibilita a absorção de água em quantidade suficiente, para balancear a perda durante a transpiração na estação seca, mantendo o potencial hídrico foliar relativamente alto neste período.

### 3. Trocas gasosas

Os resultados médios sazonais para a fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática, observados as 10 e 12 horas, estão apresentados na Figura 4. As maiores taxas de fotossíntese líquida e transpiração foram verificadas na estação chuvosa ( $p < 0,05$ ), sendo estas 47% e 45% superiores, respectivamente, àquelas



**FIGURA 3.** Valores médios do potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) nas estações seca (■) e chuvosa (□), às 7:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média  $\pm$  o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.



**FIGURA 4.** Valores sazonais médios da fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (g<sub>s</sub>), referentes à estação seca (■) e chuvosa (□), às 10:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média  $\pm$  o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

observadas na estação seca (Figuras 4a e b). A fotossíntese líquida mostrou-se mais elevada no período da manhã, apresentando ao meio dia, um decréscimo de 27% em seus valores, associado ao fechamento estomático, ocasionado por uma maior demanda atmosférica do horário, conforme pode ser verificado na Figura 2. Os valores de fotossíntese líquida observados para a espécie em estudo, no período chuvoso, mostraram-se próximos àqueles relatados para outras espécies lenhosas do Cerrado, como *Qualea parviflora*, *Dalbergia miscolobium* e *Pterodon pubescens*, da ordem de 12,5, 8,0 e 6,0  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , respectivamente (Bustamante *et al.*, 1996).

Não foram observadas variações significativas nas taxa transpiratória entre os horários de avaliação (Figura 4b), entretanto, verificou-se que as plantas apresentaram uma restrição em seu processo transpiratório, no início do período seco (dados não mostrados). Este comportamento assemelha-se àquele relatado por Franco (2000) para espécies

lenhosas de Cerrado, que aponta que muitas espécies transpiram livremente durante o ano, algumas restringem sua transpiração somente no final da estação seca e poucas restringem sua transpiração a partir do início da estação seca.

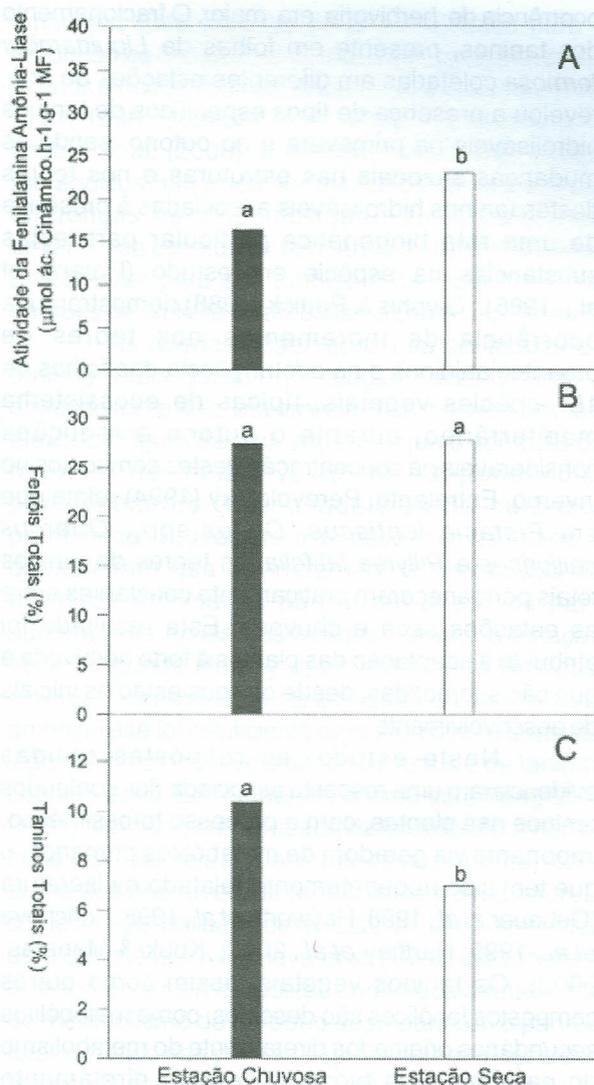
A análise do comportamento estomático (Figura 4c), nas estações chuvosa e seca revelou que a condutância estomática atingiu valores próximos em ambas às estações ( $p > 0,05$ ), indicando que o movimento estomático não respondeu às variações das condições microclimáticas do período. Estes resultados sugerem a participação de outros fatores, não estomáticos, nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas. Alguns estudos revelam que fatores como radiação, temperatura e déficit de pressão de vapor, além da redução na concentração e atividade da enzima rubisco, fotoinibição e redução na eficiência fotoquímica do fotossistema II, exercem um controle importante sobre as trocas gasosas, e, principalmente, sobre a fotossíntese (Patakas, 1993; Souza, 1999).

#### 4. Atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais

Os resultados referentes às médias das estações seca e chuvosa, em relação às características analisadas estão indicados na Figura 5. Estes resultados evidenciaram uma maior atividade da fenilalanina amônia-liase na estação seca, sendo esta cerca de 30% superior àquela observada na estação chuvosa ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas variações nos conteúdos de fenóis totais entre as estações, entretanto, um declínio significativo nos teores de taninos totais foi verificado na estação seca, sendo este da ordem de 33%, em média.

As variações observadas na atividade da fenilalanina amônia-liase mostraram uma coincidência relevante com as mudanças ocorridas nas condições microclimáticas, nas estações seca e chuvosa. Menores atividades foram características de períodos com menores amplitudes térmicas e maiores precipitações, isto é, de meses típicos da estação chuvosa, enquanto que as maiores atividades foram verificadas em condições opostas, ou seja, nos períodos mais frios e secos, com maiores amplitudes térmicas, característicos da estação seca (Figuras 1 e 5a).

Segundo Rivero *et al.* (2001) e Chakraborty *et al.* (2001), a atividade da fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, especialmente ao estresse térmico, sendo considerada por muitos autores como "proteínas do estresse", relacionando-se com desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas. Solecka *et al.* (1999) descrevem que condições naturais, as plantas são expostas a flutuações na temperatura, que podem manifestar-se



**FIGURA 5.** Valores sazonais médios de atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e teores de fenóis (B) e taninos totais (C), referentes às estações seca e chuvosa. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2002.

como variações rápidas ou como flutuações sazonais, repetidas por vários meses. Estas mudanças geralmente aparecem combinadas com modificações de outros fatores ambientais como qualidade de luz, irradiância e disponibilidade de água e podem levar a injúrias irreversíveis ou à indução de uma cascata de reações, resultando em um ajustamento das plantas às condições de estresse (Huner *et al.*, 1996). Segundo Janas *et al.* (2000) e Chakraborty *et al.* (2001), a exposição a baixas temperaturas dispara mudanças fisiológicas e bioquímicas, que levam as plantas a ajustarem-se a estas condições. Atualmente, vários trabalhos têm relacionado o efeito das baixas temperaturas, com um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase, em diferentes espécies vegetais, como *Solanum tuberosum* L.,

*Brasica napus* L., *Glicine max* (L.) Merr., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Citrullus lanatus* [Thomb.] Mansf. (Graham & Patterson, 1982; Solecka & Kacperska, 1995; Solecka *et al.*, 1999; Janas *et al.*, 2000 e Rivero *et al.*, 2001). Entretanto, faltam informações sobre os mecanismos responsáveis pela ativação desta enzima, sob baixas temperaturas (Solecka & Kacperska, 1995). Grandes avanços têm sido notados, porém, em relação ao aumento nos níveis da fenilalanina amônia-liase, nestas condições. Acredita-se que as concentrações da enzima aumentam com a diminuição da temperatura, porque o padrão de síntese sofre uma menor redução do que o padrão de degradação (Jones, 1984).

Segundo Solecka & Kacperska (1995), vários compostos fenólicos podem estar envolvidos nas respostas e na proteção de plantas ao estresse provocado pela redução na temperatura. Um acúmulo destes compostos tem sido geralmente observado, como consequência de um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase (Solecka & Kacperska, 1995; Janas *et al.*, 2000; Rivero *et al.*, 2001). Entretanto, para Margna (1977), estas evidências não são absolutas, pois a fenilalanina amônia-liase e polifenóis relacionados podem exibir respostas opostas, sob a influência de diferentes fatores ambientais. Desta maneira, dentro de certos limites fisiológicos, modificações em determinadas condições do ambiente, como aquelas que caracterizam as estações seca e chuvosa, podem resultar em um aumento na atividade enzimática e em uma redução no acúmulo destes compostos, ou vice-versa, ou ainda, até mesmo, em uma falta de correlação entre estas características. De acordo com Jones (1984), aumentos na atividade da fenilalanina amônia-liase nem sempre estão relacionados com aumentos nos teores de fenóis totais, além do que modificações nos níveis de um determinado composto fenólico podem ocorrer, sem que haja, necessariamente, correspondência com mudanças nos níveis dos fenóis totais.

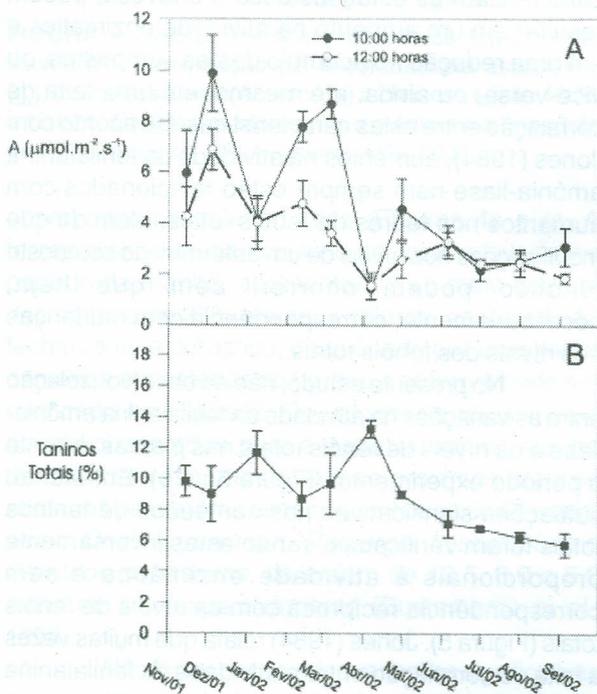
No presente estudo, não se observou relação entre as variações na atividade da fenilalanina amônia-liase e os níveis de fenóis totais nas plantas durante o período experimental (Figura 5a e b). Entretanto, flutuações significativas nos conteúdos de taninos totais foram verificadas, sendo estas inversamente proporcionais à atividade enzimática e sem correspondência recíproca com os níveis de fenóis totais (Figura 5). Jones (1984) relata que muitas vezes a falta de correlação entre a atividade da fenilalanina amônia-liase e os níveis de fenóis totais está na dependência, principalmente, da baixa disponibilidade de substrato primário, isto é, do aminoácido fenilalanina e não propriamente no aumento da atividade enzimática.

Considerando-se simultaneamente as

respostas fisiológicas do murici, em especial o comportamento fotossintético e as variações nos teores de taninos totais durante o período experimental, verifica-se que, em geral, os níveis de taninos acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, sendo os maiores valores observados em meses correspondentes à estação chuvosa, enquanto que reduções significativas foram notadas na estação seca (Figura 6).

Os picos observados em relação aos conteúdos de taninos totais, nos meses de janeiro e abril refletem a alta taxa assimilatória das plantas nos meses de dezembro de 2001 e março de 2002, uma vez que as coletas foram realizadas, geralmente, no início de cada mês. Esta possibilidade também é válida para explicar a queda acentuada destes teores no mês de maio, provavelmente em decorrência das baixas taxas fotossintéticas verificadas em abril.

Variações sazonais significativas nos teores de taninos totais e em tipos específicos de taninos têm sido detectadas em várias espécies vegetais, assim como para outras, não se têm encontrado respostas significativas. Feeny (1968), em estudos realizados com *Quercus robur* L., uma espécie lenhosa decídua, mostrou que os teores de taninos nas folhas maduras desta espécie aumentaram de 0,5%, para 5% durante a estação de crescimento das plantas, correspondentes aos meses de maio e setembro, respectivamente, período este cuja



**FIGURA 6.** A. Valores médios de fotossíntese líquida; B. Teores médios de taninos totais durante o período experimental. Cada barra representa a média  $\pm$  o erro padrão de 6 observações para a fotossíntese líquida e 3 observações para teores de taninos totais. UFLA. Lavras, MG, 2002.

ocorrência de herbivoria era maior. O fracionamento dos taninos, presente em folhas de *Liquidambar formosa* coletadas em diferentes estações do ano, revelou a presença de tipos específicos de taninos hidrolisáveis na primavera e no outono, sendo as mudanças sazonais nas estruturas e nos teores destes taninos hidrolisáveis associadas à presença de uma rota biogenética particular para estas substâncias na espécie em estudo (Hatano et al., 1986). Glyphis & Puttick (1988) demonstraram a ocorrência de incrementos nos teores de proantocianidinas e na adstringência das folhas de 15 espécies vegetais, típicas de ecossistema mediterrâneo, durante o outono e reduções consideráveis na concentração destes compostos no inverno. Entretanto, Perevolotsky (1994) relata que em *Pistacia lentiscus*, *Cistus* spp., *Quercus calliprinos* e *Pillyrea latifolia*, os teores de taninos totais permaneceram praticamente constantes entre as estações seca e chuvosa. Este resultado foi atribuído à adaptação das plantas à forte herbivoria a que são submetidas, desde os seus estádios iniciais de desenvolvimento.

Neste estudo, as respostas obtidas evidenciaram uma resposta associada dos conteúdos de taninos nas plantas, com o processo fotossintético, importante via geradora de metabólitos primários, o que tem sido freqüentemente relatado na literatura (Gebauer et al., 1998; Heyworth et al., 1998; Koricheva et al., 1998; Hartley et al., 2000; Kouki & Manetas, 2002). Os taninos vegetais, assim como outros compostos fenólicos são descritos, como metabólitos secundários originados diretamente do metabolismo do carbono. Sua biossíntese está diretamente relacionada aos processos de crescimento e diferenciação celular, regulados pela disponibilidade de recursos ambientais e que, segundo Lavola et al. (2000), podem competir com a alocação de carbono para o metabolismo secundário. Para Koricheva et al. (1998), os níveis destes metabólitos estão, em parte, sob o controle genético, sendo determinados também pelas condições ambientais.

Atualmente, várias hipóteses têm sido elaboradas para explicar o envolvimento dos padrões evolucionários e fenotípicos no acúmulo e na distribuição de metabólitos derivados do metabolismo do carbono, sob determinadas condições ambientais, que tendem a aumentar o conteúdo de carboidratos não estruturais. Em geral, estas hipóteses sugerem que as condições do ambiente que restringem em maior proporção o crescimento vegetal do que a fotossíntese, como luz, temperatura, disponibilidade de água e concentração de  $\text{CO}_2$ , combinadas com uma baixa disponibilidade de nutrientes, tendem a produzir uma alta relação carbono:nutrientes e um excesso de carboidratos não estruturais, que se acumulam nas folhagens de plantas herbáceas e

lenhosas. Este excesso pode ser alocado para a produção de compostos derivados do carbono, como taninos e outros tipos de fenólicos vegetais (Heyworth *et al.*, 1998; Gebauer *et al.*, 1998). De acordo com Lavola *et al.* (2000), a variação nos teores destes metabólitos não pode ser explicada somente pelas diferenças na disponibilidade de carboidratos, devendo-se considerar também a disponibilidade de precursores para sua síntese e as mudanças nos padrões de síntese e catabolismo destes compostos.

As quedas observadas nos conteúdos de taninos totais durante a estação seca, quando a atividade da fenilalanina amônia-liase mostrou-se mais elevada (Figura 5a e c), sugerem que o acúmulo de taninos no murici está na dependência, principalmente, dos esqueletos de carbono, produzidos através do processo fotossintético e demonstram que os incrementos verificados na atividade enzimática não foram decisivos para aumentar os níveis dos taninos durante a estação seca. Segundo Hartley *et al.* (2000), em *Spergula arvensis* um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase foi insuficiente para promover alterações significativas nos níveis de fenóis totais e de taninos condensados. Entretanto, de acordo com Peng *et al.* (1991), aumentos na atividade da fenilalanina amônia-liase não se relacionam necessariamente, com aumentos nos níveis de fenólicos se outros fatores, como a disponibilidade de fenilalanina forem limitantes para o processo. Koricheva *et al.* (1998) demonstram que somente os metabólitos originados diretamente do metabolismo do carbono acompanham o padrão fotossintético das plantas e que a determinação dos teores de fenóis totais pode não ser uma medida representativa destas respostas.

## CONCLUSÃO

O potencial hídrico foliar não apresentou variações sazonais significativas, indicando que as plantas encontravam-se em condições hídricas similares nas estações seca e chuvosa.

As plantas apresentaram maiores taxas fotossintética e transpiratória na estação chuvosa e a condutância estomática atingiu valores próximos em ambas as estações, sugerindo a participação de fatores não estomáticos nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas.

As plantas de murici apresentaram maior atividade da fenilalanina amônia-liase e menores teores de taninos totais na estação seca e os níveis de fenóis totais permaneceram constantes durante todo o período experimental.

A atividade da fenilalanina amônia-liase respondeu diretamente às variações ambientais, características das estações seca e chuvosa, entretanto, os níveis de taninos totais acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, nas

estações seca e chuvosa.

O aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase não está relacionado à elevação nos teores dos fenóis e taninos totais na espécie em estudo e modificações nos teores de taninos totais não estão, necessariamente, associados a alterações nos níveis dos fenóis totais.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDALA, G.C., CALDAS, L.S., HARIDASAN, M. *et al.* Above and belowground organic matter and root:shoot ratio in a cerrado in central Brazil. **Brazilian Journal of Ecology**, v.2, n.1, p.11-23, 1998.
- ABRAMS, M.D., MOSTOLLER, S.A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. **Tree Physiology**, v.15, n.6, p.361-70, 1995.
- ADÂMOLI, J., MACÉDO, J., AZEVEDO, L.G. *et al.* Caracterização da região dos Cerrados: In: GOEDERT, W.J. (Ed.). **Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. São Paulo: Nobel, 1986. p.33-74.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. *et al.* **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- ASSIS, J.S., MALDONADO, R., MUNOZ, T. *et al.* Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.23, n.1, p.33-9, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the association of official analytical chemists**. 11.ed. Washington, 1970. 1015p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normas climatológicas**. Brasília, 1992. 84p.
- BUSTAMANTE, M.M.C., KOZOVITS, A.R., SILVA, L.F. *et al.* Assimilação de nitrato e taxas Fotossintéticas de três espécies lenhosas de Cerrado. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 3., 1996, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 1996. p.49-53.
- CHAKRABORTY, U., DUTTA, S., CHAKRABORTY, B. Drought induced biochemical changes in young tea leaves. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.6, n.1, p.103-6, 2001.
- CHENG, S.H., SHEEN, J., GERRISH, C. *et al.* Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v.503, n.2/3, p.185-8, 2001.

- DE BRUYNE, T., PIETERS, L., DEELSTRA, H. *et al.* Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.27, n.4, p.445-59, 1999.
- FEENY, P.P. Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. **Phytochemistry**, v.7, n.5, p.871-80, 1968.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar/SIB, 2000. p.255-8.
- FRANCO, A.C. Seasonal patterns of gas exchange, water relations and growth of *Roupala montana*, an evergreen savana species. **Plant Ecology**, v.136, n.1, p.69-76, 1998.
- FRANCO, A.C. Water and light used strategies by Cerrado woody plants. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2000, Brasília, DF. **Tópicos Atuais em Botânica**. Brasília, 2000. p.292-8.
- GEBAUER, R.L.E., STRAIN, B.R., REYNOLDS, J.F. The effect of elevated CO<sub>2</sub> and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). **Oecologia**, v.113, n.1, p.29-36, 1998.
- GLYPHIS, J.P., PUTTICK, G.M. Phenolics in some southern african mediterranean shrubland plants. **Phytochemistry**, v.27, n.3, p.743-751, 1988.
- GRAHAM, T.L., PATTERSON, B.D. Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.347-82, 1982.
- HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, n.3, p.437-449, 1987.
- HARTLEY, S., JONES, C.G., COUPER, G.C. *et al.* Biosynthesis of plant phenolics compounds in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. **Global Change Biology**, v.6, p.497-506, 2000.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.205-15, 1996.
- HATANO, T., KIRA, R., YOSHIZAKI, M.L. *et al.* Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. **Phytochemistry**, v.25, n.12, p.2787-9, 1986.
- HEYWORTH, C.J., IARSON, G.R., TEMPERTON, V. *et al.* The effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration and nutrient supply on carbon-based plant secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. **Oecologia**, v.115, n.3, p.344-50, 1998.
- HUNER, N.P.A., MAXWELL, D.P., GRAY, G.R. *et al.* Sensing environmental temperature change through imbalance between energy supply and energy consumption:redox state of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, v.98, n.2, p.358-4, 1996.
- JANAS, K., CVIKROVÁ, M., PALAGIEWICZ, A. *et al.* Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.7/8, p.587-93, 2000.
- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v.23, n.7, p.1349-59, 1984.
- KORICHEVA, J., LARSSON, S., HAUKIOJA, E. *et al.* Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability:hypothesis testing by means of meta-analysis. **Oikos**, v.83, n.2, p.212-26, 1998.
- KOUKI, M., MANETAS, Y. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Cerotonia siliqua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, n.7, p.631-9, 2002.
- LAVOLA, A. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. **Tree Physiology**, v.18, n.1, p.53-8, 1998.
- LAVOLA, A., TITTO, R.J., ROSA, T.M.de la *et al.* Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO<sub>2</sub> exposure. **Physiologia Plantarum**, v.109, n.3, p.260-7, 2000.
- MARGNA, U. Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cell. **Phytochemistry**, v.16, n.4, p.419-26, 1977.
- MATOS, E.A., REINERT, F., MORAES, J.A.P.V. Comparation of carbon isotope discrimination and CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O exchange between the dry and the wet season in leaves of several Cerrado woody species. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.1, p.77-82, 1997.
- MEDINA, E., FRANCISCO, M. Photosynthesis and water relations of savanna tree species differing in leaf phenology. **Tree Physiology**, v.14, n.12, p.1367-81, 1994.
- MEINZER, F.C., GOLDSTEIN, G., FRANCO, A.C. *et al.* Atmospheric and hydraulic limitations on transpiration in Brazilian cerrado woody species. **Functional Ecology**, v.13, n.2, p.273-82, 1999.
- PATAKAS, A. Diurnal changes in gas exchange and water relations in field growth grapevines. **Acta Horticulturae**, v.335, p.251-6, 1993.
- PENG, S., SCALBERT, A., MONTIES, B. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* e *Quercus petraea* woods. **Phytochemistry**, v.30, n.3, p.775-8, 1991.
- PEREVOLOTSKY, A. Tannins in mediterranean woodland species: lack of response to browsing

- and thinning. **Oikos**, v. 71, n. 2, p. 333-40, 1994.
- PIVELLO, V.R., COUTINHO, L.M. Transfer of macronutrients to the atmosphere during experimental burnings in an open Cerrado (Brazilian savanna). **Journal of Tropical Ecology**, v.8, n.4, p.487-97, 1992.
- RIVERO, R.M., RUIZ, J.M., GARCIA, P.C. *et al.* Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v.160, n.2, p.315-21, 2001.
- ROBERTS, J.M., ROSIER, P.T.W., SRINIVASA MURTHY, K.V. Physiological studies in young eucalyptus stands in Southern India and their use in estimating forest transpiration. In: CALDER, I.R., HALL, R.L., ADLARD, P.G. (Ed.). **Growth and water use of forest plantations**. Chichester: John Wiley & Sons, 1992. p.226-43.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.
- SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v.21, n.1, p.61-9, 2000.
- SANTOS, S., PALAZZO DE MELLO, J.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000. p.517-44.
- SARMIENTO, G. **The ecology of neotropical savannas**. Cambridge: Harvard University Press, 1983. 235p.
- SCOTT, A.J., KNOTT, M.A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-12, 1974.
- SOLECKA, D., BOUDET, A.M., KACPERSKA, A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. **Plant Physiology Biochemistry**, v.37, n.6, p.491-6, 1999.
- SOLECKA, D., KACPERSKA, A. Phenylalanine ammonia-lyase in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, Montrouge, v.33, n.5, p.585-91, 1995.
- SOUZA, C.R. **Alguns aspectos da enxertia de mesa com forçagem e respostas fisiológicas à deficiência hídrica na produção de mudas de videira**. 1999. 75f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.