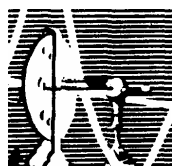


Bianca Ortiz da Silva

**Análise Estrutural e Histoquímica de
Croton macrobothrys Baillon e *Croton
floribundus* Spreng (Euphorbiaceae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bianca Ortiz da Silva

**Análise Estrutural e Histoquímica de
Croton macrobothrys Baillon e *Croton
floribundus* Spreng (Euphorbiaceae)**

Volume único

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Parasitologia – Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientador: Ricardo Pereira Louro

Rio de Janeiro, 2006

Silva, Bianca, O. Análise estrutural e Histoquímica de *Croton macrobothrys* Baillon e *Croton floribundus* Spreng (Euphorbiaceae). Rio de Janeiro, 2006. XII + 150p

Dissertação Mestrado em Biologia Celular - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

Orientador: Ricardo Pereira Louro

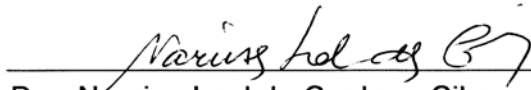
1. Euphorbiaceae. 2. *Croton*. 3. Anatomia da folha. 4. Anatomia do caule.
5. Ultraestrutura. 6. Histoquímica.

**“Análise estrutural de *Croton macrobothrys*
Baillon e *Croton floribundus* Spreng”**

BIANCA ORTIZ DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR :

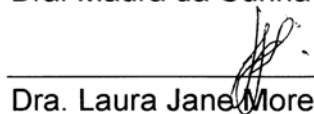


Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva

(Presidente da Banca)



Dra. Maura da Cunha



Dra. Laura Jane Moreira Santiago

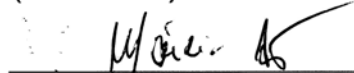


Dra. Rossiane Claudia Vommaro



Dr. Ricardo Pereira Louro

(Orientador)



Dra. Marcia Attias

(Revisora)

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

07 de julho de 2006

À Deus por fazer nascer à natureza, fruto do estudo; permitir que coisas impossíveis possam se tornar possíveis, por me dar força e coragem para vencer as barreiras e pular os degraus que a vida nos coloca. Pela inspiração e sabedoria.

À minha dupla mãe, Telma, pelo amor e dedicação eternos, pelo incentivo e pelas palavras amigas nos momentos da minha vida em que mais preciso.

Ao meu pai, Carlos, *in memoriam*, do qual herdei o “gene” da perseverança e extrema coragem, e mesmo ausente sempre me encoraja.

À minha irmã, Ana Paula, que não mediu esforços para que tudo desse certo.

Ao meu padrasto, Alberto, que sempre me levantava o moral e me incentivou ao longo desses dois anos.

Às minhas tias Márcia, Tônia e Isis e tio Bira, afilhada Beatriz e aos meus vizinhos Rose e D. Nilceia, que sempre torceram, mesmo sem saber como para que tudo desse certo.

Às minhas primas, Rejane, Renata, Rosana, Renata Coutinho, que reclamavam minha ausência e se admiravam da incessante necessidade de estudar.

Aos meus padrinhos, Maria das Graças e Aurélio *in memoriam* que sempre me incentivaram ao longo da minha caminhada.

Aos meus amigos: Márcia, quase orientadora e muito amiga; Miriam, por me falar que eu era capaz mesmo quando estava pronta a desistir; Hellen, por conversas animadoras; Carla, Mariana e Vanessa, pelo convívio e amizade; Ronaldo pelas conversas e consultorias, Maria que sempre me auxiliava nas tarefas que eu sempre negligenciava, Bruno, Gercino, Ivonete, Chiquinho, Jorginaldo, Cordelia, Binho, Lúdia, Luciana, Luis, Dona Ligia, Tio Walmir, Seu Francisco e Seu Moacir, pela sincera amizade e pela alegria que sempre melhoravam o dia.

A todos os funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos secretários da pós-graduação Diogo, Rita e Sandra, pela presteza e competência nos serviços prestados.

A Lisieux, que contribuiu com conversas amigas e artigos valiosíssimos.

Aos meus amigos invisíveis que sempre me conduziram a melhor decisão.

A todos que não foram citados, mas estão guardados no meu coração para sempre.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis / Parque Nacional da Serra dos Órgãos, pela licença de coleta do material botânico.

A FAPERJ pelo financiamento da pesquisa nas fases iniciais.

Aos Drs. Wanderley de Souza, Márcia Attias, Narcisa Cunha e Silva, responsáveis pelo Laboratório de Ultraestrutura Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pela acolhida e uso dos equipamentos.

A Dr^a. Thais B. Souto-Padron e Ulysses Casado responsáveis pelo Laboratório de Ultraestrutura do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes pela acolhida e uso dos equipamentos.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Pereira Louro, do Laboratório de Ultraestrutura Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela paciência e dedicação nos quatro anos de convívio.

Por último, sem menos importância, ao meu amigo, noivo, esposo e amor FERNANDO pelas ausências sempre entendidas, pelos finais de semana no Fundão, pela dedicação ao longo desses onze anos e, principalmente, pelo amor eterno e irrestrito...

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

Análise Estrutural e Histoquímica de *Croton macrobothrys* Baillon e *Croton floribundus* Spreng.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Parasitologia – Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

As espécies do gênero *Croton* são consideradas fontes de metabólitos secundários de importância farmacológica. Com a finalidade de fornecer informações adicionais sobre espécies deste gênero, estudos foram realizados sobre a anatomia e ultraestrutura, assim como a localização dos principais sítios de síntese e acumulação dos compostos secundários de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus*.

Folhas e caules de ambas as espécies em sucessivos estádios de desenvolvimento, foram analisados através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Foi observado que ambas as espécies apresentam folhas dorsiventrais, hipostomáticas e revestidas por tricomas. Em *Croton macrobothrys* os tricomas são estrelados, enquanto em *Croton floribundus* os tricomas são do tipo dendrítico, estrelado, acicular e glandular. Em ambas as espécies, os tricomas originam-se a partir das células epidérmicas e parenquimáticas adjacentes. Em *Croton floribundus* as células parenquimáticas adjacentes após a diferenciação formam os traqueídes que conectam os tricomas aciculares da face adaxial com os dendríticos da face abaxial.

Em ambas as espécies, a lâmina foliar é formada por uma camada de células epidérmicas, parênquima paliçádico uniestratificado e parênquima lacunoso com 4-7 camadas celulares. Os cloroplastos dos parênquimas paliçádico e lacunoso possuem numerosos grãos de amido e plastoglôbulos, os quais são mais diferenciados em *Croton floribundus*.

Nos estádios iniciais de desenvolvimento o caule de ambas as espécies é formado por epiderme uniestratificada, parênquima cortical com camadas celulares de diferentes dimensões e sistema vascular com feixes colaterais, formando um anel contínuo. Os laticíferos localizam-se próximo à região do floema e os idioblastos distribuem-se aleatoriamente no parênquima cortical. *Croton floribundus* distingui-se de *Croton macrobothrys* pela maior frequência de idioblastos taníferos, drusas de oxalato de cálcio no parênquima cortical e presença de fibras gelatinosas no xilema.

Testes histoquímicos de folhas de *Croton macrobothrys*, durante os estádios iniciais de desenvolvimento demonstraram que os sítios de acúmulo de compostos fenólicos ocorrem principalmente nas células do parênquima paliçádico, enquanto que em *Croton floribundus*, as substâncias fenólicas são depositadas preferencialmente no parênquima lacunoso e distribuídas randomicamente no parênquima paliçádico.

Em *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* as células acumuladoras de terpenos, compostos fenólicos e lipídios encontram-se distribuídas randomicamente nos caules primário e secundário, embora o número de células acumuladoras de lipídios seja maior no parênquima cortical de *Croton floribundus*. Em ambas as espécies os laticíferos apresentam conteúdo misto, evidenciado pela presença de substâncias terpênicas, fenólicas e lipídicas.

ABSTRACT

Members of *Croton* spp are considered source of secondary metabolites of pharmacological purpose. Aiming to furnish additional date on species of this genus, in this we studied the *Croton macrobothrys* Baillon and *Croton floribundus* Spreng anatomy and ultrastructure as well as, the main sites synthesis and accumulation of secondary compounds. Leaves and stem of both species in successive stages of development were analyzed by light and transmission and scanning electron microscopy. It was observed that both species presented leaves with dorsiventral, hypostomatic, covered with trichome. The trichomes are stellate in *C. macrobothrys*, while in *C. floribundus* they showed the dendritic, stellate, acicular and glandular type. In both the species the trichomes are originated from epidermic and adjacent parenchymatic cells. In *C. floribundus* the adjacent parenchymatic cells form the tracheids which connected the adaxial acicular with abaxial dendritic trichomes.

In both species the leaf blade is formed by only one epidermic cell layer, unistratified palisade parenchyma and 4-7 layers of spongy cells. The chloroplasts of palisade and spongy parenchyma showed numerous starch grains and plastoglobules, which are more differentiated in *C. floribundus*.

In the earlier stages of development, the stem of both the species is formed by unistratified epidermis, cortical parenchyma with cells layers of different dimensions the vascular system presents collateral bundles forming a close ring. The laticifers are localized next to the phloem and the idioblasts are randomly distributed in cortical parenchyma. *Croton floribundus* can be distinguished from the *C. macrobothrys* by the tannifers idioblasts, calcium oxalate druses in cortical parenchyma frequency and the presence of gelatinous fibers.

Histochemical tests on *Croton macrobothrys* leaves during the earlier stages of development showed that the phenolic sites occur in palisade parenchyma cells, while in *Croton floribundus* the phenolic substances are deposited preferentially in spongy parenchyma cells randomly distributed through the palisade parenchyma.

In *Croton macrobothrys* and *Croton floribundus* the terpenes, phenolics and lipid cells are randomly distributed through the primary and secondary stems, although the frequency of lipid cells is higher in cortical parenchyma of *C. floribundus*. In both of the species the laticiferous present a miscellaneous content evidenced by terpenic, phenolic and lipidic substances.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	III
DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
EPÍGRAFE.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
SUMÁRIO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Plantas medicinais.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Compostos secundários em plantas.....</i>	<i>2</i>
1.2.1 <i>Compostos Fenólicos.....</i>	<i>4</i>
1.2.2 <i>Terpenos.....</i>	<i>6</i>
1.2.3 <i>Alcalóides.....</i>	<i>9</i>
1.3 <i>A família Euphorbiaceae.....</i>	<i>14</i>
1.4 <i>O gênero Croton.....</i>	<i>15</i>
1.5 <i>Constituintes químicos das espécies de Croton e sua atividade biológica.....</i>	<i>16</i>
1.6 <i>Croton macrobothrys e Croton floribundus.....</i>	<i>17</i>
1.7 <i>Morfologia interna do gênero Croton.....</i>	<i>18</i>
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>21</i>
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	22
3.1 <i>Coleta do material.....</i>	<i>22</i>
3.2 <i>Material estudado.....</i>	<i>22</i>
3.3 <i>Microscopia óptica.....</i>	<i>22</i>
3.4 <i>Estudos Histoquímicos.....</i>	<i>23</i>

3.4.1 Detecção de amido.....	23
3.4.2 Detecção de lipídeos.....	24
3.4.2.1 Lipídeos totais.....	24
3.4.3 Detecção de Terpenos.....	24
3.4.3.1 Óleos essenciais e oleoresinas.....	24
3.4.3.2 Terpenos com grupo carbonila.....	25
3.4.3.3 Terpenos.....	25
3.4.4 Detecção de substâncias fenólicas.....	25
3.4.5 Detecção de alcalóides.....	26
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	26
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
 4 RESULTADOS.....	 29
4.1 <i>Croton macrobothrys</i> Baillon.....	29
4.1.1 Folha.....	29
4.1.1.1 Epiderme.....	29
4.1.1.1.1 Ontogenia e estrutura dos tricomas tectores.....	30
4.1.1.2 Mesofilo.....	31
4.1.2 Caule.....	32
4.1.3 Testes Histoquímicos.....	36
4.1.3.1 Folha.....	36
4.1.3.2 Caule.....	38
4.2 <i>Croton floribundus</i> Spreng.....	39
4.2.1 Folha.....	39
4.2.1.1 Epiderme.....	39
4.2.1.1.1 Ontogenia e estrutura dos tricomas tectores.....	40
4.2.1.1.2 Tricoma glandular.....	42
4.2.1.2 Mesofilo.....	43
4.2.2 Caule.....	44
4.2.3 Testes Histoquímicos.....	45
4.2.3.1 Folha.....	45

4.2.3.2 <i>Caule</i>.....	46
5 PRANCHAS.....	50
6 DISCUSSÃO.....	109
7 CONCLUSÕES.....	125
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* apresenta espécies de grande interesse medicinal, sendo seus princípios ativos muito estudados. O estudo fotoquímico de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* iniciado pelo Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN) verificou o grande potencial farmacológico das espécies despertando interesse em analisá-las. A grande relevância dos compostos secundários presentes em ambas às espécies, aliado ao pouco conteúdo anatômico e ultraestrutural culminou no desenvolvimento desta dissertação.

1.1 As Plantas medicinais

Na busca pelos alimentos, o homem descobriu as propriedades tóxicas ou curativas das plantas. Desde os tempos mais antigos as plantas vêm sendo utilizadas nas diferentes sociedades com propósitos terapêuticos. Esse conhecimento etnobotânico acumulado ao longo das gerações tem fornecido bases para o estudo de diversos fármacos. Os métodos clássicos de utilização dos produtos naturais ocuparam um espaço de destaque na medicina moderna, incrementando a utilização de plantas medicinais pela população, incentivando as empresas a descobrir novos fármacos e, conseqüentemente, estimulando as investigações na área da fitoterapia (MARASCHI e VERPOORTE, 2003).

1.2 Compostos secundários em plantas

O metabolismo primário refere-se aos processos anabólicos e catabólicos necessários à manutenção e proliferação celular, tais como, crescimento, desenvolvimento, respiração e assimilação de nutrientes. Em contraste, os metabólitos secundários referem-se a compostos presentes em células especializadas, que não são necessários à sobrevivência celular, mas necessárias às plantas durante o seu relacionamento com o meio ambiente (KLIEBENSTEIN, 2004).

O metabolismo secundário, embora não necessariamente essencial para o organismo produtor, confere vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação em seu habitat. A diversidade de compostos secundários encontrados nas plantas esta relacionada com o táxon (THEIS e LERDAU, 2003), podendo ser específicos, genéricos ou presentes em diferentes níveis hierárquicos. Dentre os metabólitos secundários destacam-se os alcalóides, terpenos e substâncias fenólicas.

A distribuição de compostos químicos entre os diferentes *taxa* não pode ser explicada sem considerar os relacionamentos evolutivos, de forma que a filogenia não é suficiente para determinar o papel funcional de todos os compostos secundários. Fatores como condições climáticas, composição do solo e a suscetibilidade à pragas, afetam a composição química das plantas, como forma de defesa contra as agressões do meio ambiente e suas adversidades (THEIS e LERDAU, 2003).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos das plantas na natureza, segundo Rhoades (1979) foi determinado pelas necessidades de respostas ao estresse biótico e abiótico e possibilidades biossintéticas de cada táxon. A co-evolução entre as plantas e insetos, microorganismos ou mamíferos conduziram à síntese de metabólitos secundários com funções

diversas, sendo a atração de polinizadores ou de dispersores ou o mecanismo de defesa, as suas principais funções. Como exemplo da grande diversidade de compostos destacam-se os terpenos, maior grupo de produtos secundários que apresentam atividade inseticida; os compostos fenólicos, grupo quimicamente heterogêneo com propriedades alelopáticas (TAIZ e ZEIGER, 2004) e antioxidantes (VELIOGLU *et al.*, 1998, GARDNER *et al.*, 2000; MCDONALD *et al.*, 2001). Além destes, também são sintetizados alcalóides, compostos nitrogenados com estruturas diversas, apresentando funções variadas, dentre elas destaca-se a defesa contra predadores, em especial a mamíferos, em virtude da sua toxicidade geral e a capacidade de deterência (HARTMANN, 1982).

A origem de todos os metabólitos secundários ocorre a partir do metabolismo da glicose, via seus intermediários principais: a via do ácido chiquímico e a via do acetato (Esquema 1). O ácido chiquímico dá origem aos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Os derivados do acetato podem ser classificados segundo sua via metabólica em: derivados do acetato ou via ciclo do ácido cítrico, derivados do acetato ou via mevalonato, e produtos da condensação do acetato. Alguns metabólitos secundários, tais como, as antraquinonas, os flavonóides e os taninos condensados são resultantes da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste. Recentemente, uma rota alternativa foi apontada para a via dos terpenóides a partir dos intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, a rota do metileritritol fosfato (MEP). Essa via apresenta como produto final o 1- desoxy-D-xilulose-5- fosfato (DOXP) que será convertido em difosfato de isopentenila (ROHMER *et al.*, 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004).

1.2.1 Compostos Fenólicos

As plantas produzem grande variedade de metabólitos secundários que contém o grupamento fenol, caracterizado pela presença de um grupo hidroxila funcional ligado a um anel aromático. Os fenóis constituem um grupo quimicamente heterogêneo, altamente diverso, apresentando aproximadamente 10.000 compostos (SIMÕES *et al.*, 2002). Em virtude da sua grande diversidade apresentam uma variedade de funções nos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A biossíntese dos compostos fenólicos é determinada por duas vias biossintéticas, a via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, que participa da síntese da maioria dos compostos fenólicos de fungos, bactérias e plantas e a via do acetato-polimalato que inicia com o acetil coenzima A e malonil coenzima A, formadora de importantes compostos fenólicos em fungos e bactérias, assim como de compostos fenólicos menos importantes nas plantas superiores (TAIZ e ZEIGER, 2004) (Esquema 2).

A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos advindos da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos (HERRMAN e WEAVER, 1999).

A classe de compostos fenólicos mais abundante é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (Pal) (TAIZ e ZEIGER, 2004). Reações subseqüentes conduzem a adição de outros grupos hidroxila e outros substituintes. A atividade da enzima Pal é regulada por fatores bióticos e abióticos, dentre eles a concentração de cálcio (ROMERO, 2003) e outros nutrientes, bem como a luz e a infecção por patógenos (HAO *et al.*, 1996, CAMPOS *et al.*, 2004).

Os taninos são substâncias fenólicas com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água. Segundo Haslam (1988), a

denominação mais correta para esta classe de compostos secundários é o termo polifenol, mas nem todos os polifenóis são taninos (MOLE e WATERMAN, 1994).

Os taninos podem ser classificados como taninos hidrolisáveis e taninos condensados. A proantocianidina corresponde atualmente à designação que anteriormente era dada aos taninos condensados (JORDÃO, 2000). Os taninos hidrolisáveis caracterizam-se pela presença de um poliol central, geralmente β -D-glicose, cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela poli-condensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3-4-diol, sendo também denominados proantocianidinas (FREUDENBERG e WEINGES, 1958 e 1960), por produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delfinidina.

Os taninos condensados e os hidrolisáveis apresentam diferentes padrões de distribuição. Enquanto a proantocianidinas ocorrem principalmente nas Gimnospermae e inúmeras Angiospermae, os taninos hidrolisáveis estão restritos as Choripetalae das dicotiledôneas. O seu papel biológico tem sido amplamente investigado e acredita-se que estejam envolvidos na defesa química das plantas contra o ataque de microorganismos patogênicos, herbívoros, vertebrados ou invertebrados, uma vez que reduzem o crescimento e a sobrevivência destes de forma expressiva (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, entre elas, diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; DEBRUYNE *et al.*, 1999; DUFRESNE e FARNWORTH, 2001).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado atividades biológicas como a ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991; CHUNG *et al.*, 1998), antiviral (DEBRUYNE *et al.*, 1999), moluscida (MARSTON e

HOSTETTMANN, 1985) e anti-tumoral (WANG *et al.*, 1999; DUFRESNE e FARNWORTH, 2001).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos estejam relacionadas à habilidade de complexar-se a íons metálicos, características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos taninos condensados e hidrolisáveis. Por outro lado, a sua ação no tratamento de doenças pode estar intimamente ligada à atividade antioxidante (seqüestradora de radicais livres) e a habilidade de complexar-se com outras moléculas incluindo macromoléculas, entre elas proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

A ocorrência de substâncias fenólicas e em especial de proantocianidinas em espécies do gênero *Croton* tem sido amplamente documentada (CAI *et al.*, 1991; UBILLAS *et al.*, 1994; PERES *et al.*, 1997; RISCO *et al.*, 2003; RANDAU *et al.*, 2004).

1.2.2 Terpenos

Os terpenos constituem a maior família de produtos naturais encontrados nas plantas, com mais de 30.000 representantes (SACCHETTINI e POULTER 1997; DEWICK, 2002). Segundo McGarvey e Croteau (1995), de acordo com a presença de séries homólogas de unidades isoprênicas de cinco carbonos em sua estrutura, os terpenos são classificados em hemiterpenos C_5 (1 unidade isoprênica), monoterpenos C_{10} (2 unidades isoprênicas), sesquiterpenos C_{15} (3 unidades isoprênicas), diterpenos C_{20} (4 unidades isoprênicas), triterpenos C_{30} (6 unidades isoprênicas) e politerpenos $(C_5)_n$ onde n pode ser de 9 a 30.000.

A biossíntese de terpenos envolve, principalmente, a adição cabeça-cauda de difosfato de isopentenila (IPP, unidade ativa do isopreno C₅), ao isômero difosfato de dimetilalila (DMSP) sintetizando difosfato de geranila (GPP, C₁₀). A condensação da enzima de ligação difosfato de geranila com unidades adicionais de IPP forma sucessivamente grandes cadeias de difosfato de prenila, tais como difosfato de farnesila (FPP, C₁₅), difosfato de geranylgeranila (GGPP, C₂₀) que podem sofrer ciclização ou rearranjos para a produção de esqueleto carbono dos sesquiterpenos e diterpenos (SINGH *et al.*, 1989; MCGARVEY e CROTEAU, 1995; LUTHRA *et al.*, 1999b). Frequentemente FPP e GGPP dimerizam para produção de precursores da síntese de triterpenos e tetraterpenos, respectivamente (Esquema 2).

Os terpenos nas plantas são sintetizados por duas vias, a via acetato mevalonato e a via não mevalonato (Esquema 2). Em ambas as vias, as preniltransferases atuam na condensação de unidades isoprênicas (LICHTENTHALER, 1999; ROHMER *et al.*, 1999).

O caminho clássico da via do mevalonato envolve a condensação de três unidades de acetil CoA para formar 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) que, posteriormente, é reduzido a mevalonato. Este é subsequentemente transformado para difosfato de isopentenila via três estágios sequências envolvendo fosforilação e descarboxilação. A redução de HMG-CoA para MVA é catalizada por HMG-CoA redutase.

Entretanto, na rota alternativa do metileritritol fosfato (MEP) (ROHMER *et al.*, 1999) foi proposto à condensação cabeça-cabeça de D- gliceraldeído - 3 fosfato (GAP, uma triose) e um acetaldeído ativado derivado do piruvato, resultando na formação de 1- desoxy-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) como o primeiro precursor do novo caminho biossintético, que eventualmente será convertido em difosfato de isopentenila (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Em vegetais superiores a via acetato-mevalonato (Ac-MVA) ocorre no citoplasma e na mitocôndria, sintetizando principalmente esteróis. Entretanto nos plastídios, os terpenos são

formados exclusivamente pela via do não mevalonato (não-MVA) (LICHTENTHALER 1999, ROHMER *et al.*, 1999; EISENREICH *et al.*, 2001).

Os terpenos são funcionalmente diversos, participando do metabolismo integral, a exemplo dos hormônios giberelina e ácido abscísico ou exercendo papel nas membranas e pigmentos fotossintéticos, como os carotenóides (TORSSELL, 1997; COSTA, 2002). Nos carotenóides participam na transferência de elétrons como plastoquinona e ubiquinona e seus derivados (TORSSELL, 1997; SIMÕES *et al.*, 2002; COSTA, 2002). Podem ainda, participar de fenômenos biológicos como atração de polinizadores sob a forma de feromônios ou precursores de feromônios ou exercer função tóxica contra herbivoria ou fungos (PICKETT, 1991; CROCK *et al.*, 1997; TORSSELL, 1997; COSTA, 2002; THEIS e LERDAU, 2003).

Além destas atribuições, os terpenóides exercem um papel importante na produção e atividade biológica do látex. O látex é produzido por aproximadamente 200 espécies vegetais e sua produção demanda elevado custo energético para as plantas (KIM *et al.*, 2003; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2006). Entretanto sugere-se que possua atividade contra ataque de predadores, microorganismos e formação de feridas (JOHN, 1993). Foi demonstrado que a coagulação do látex envolve a agregação de partículas de borracha sendo de importância vital para a defesa contra a possível penetração de patógenos nos tecidos lesados (GIDROL *et al.*, 1994 ; SOO *et al.*, 1999).

A característica funcional do látex é atribuída a sua composição química que apresenta diferenças qualitativas e quantitativas entre si. Experimentos *in vitro* demonstraram que a síntese de borracha requer a presença de isopentenil pirofosfato (IPP), um dos precursores da via dos terpenóides (SOO *et al.*, 1999).

1.2.3 Alcalóides

Um alcalóide, segundo Pelletier (1998), é “uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo, cuja distribuição é limitada entre organismos vivos”. Os alcalóides são encontrados em microorganismos, animais marinhos e em vegetais superiores, principalmente nas Angiospermas. Na estrutura molecular básica dos alcalóides estão presentes um ou mais átomos de nitrogênio, tipicamente primário, secundário ou com amina terciária. Esta característica lhes confere pH básico, facilitando a sua purificação e isolamento.

A biossíntese dos alcalóides inicia-se a partir da modificação do aminoácido precursor. Os aminoácidos são modificados através de descarboxilação, condensação do aldol, aminação e metilação (FACCHINI, 2001). A maioria dos alcalóides é originada pela descarboxilação de aminoácidos, principalmente lisina, tirosina e triptofano, sendo classificados de acordo com o aminoácido que cedeu os átomos de nitrogênio e a porção fundamental para a formação do seu esqueleto. Esta biossíntese é regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento do organismo (FACCHINI, 2001). A expressão das vias biossintéticas em células e tecidos pode conduzir a acumulação dos produtos finais nas próprias células onde a biossíntese foi iniciada, ou os intermediários biossintéticos podem ser transportados para outros órgãos promovendo a elaboração de diferentes produtos finais (SIMÕES *et al.*, 2002).

Os alcalóides podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, embora este acúmulo seja preferencial em um ou mais órgãos. Estudos demonstram o acúmulo de alcalóides em tecidos com crescimento ativo, em células epidérmicas e em células hipodérmicas, em bainhas vasculares e em laticíferos, sendo raramente encontrados em tecidos mortos (PELLETIER, 1988; EVANS, 1996). As enzimas envolvidas na biossíntese de alcalóides distribuem-se em diversos

compartimentos subcelulares, incluindo retículo endoplasmático, vacúolo, citoplasma, membrana do tonoplasto, estroma do cloroplasto e nas membranas dos tilacóides (FACCHINI, 2001).

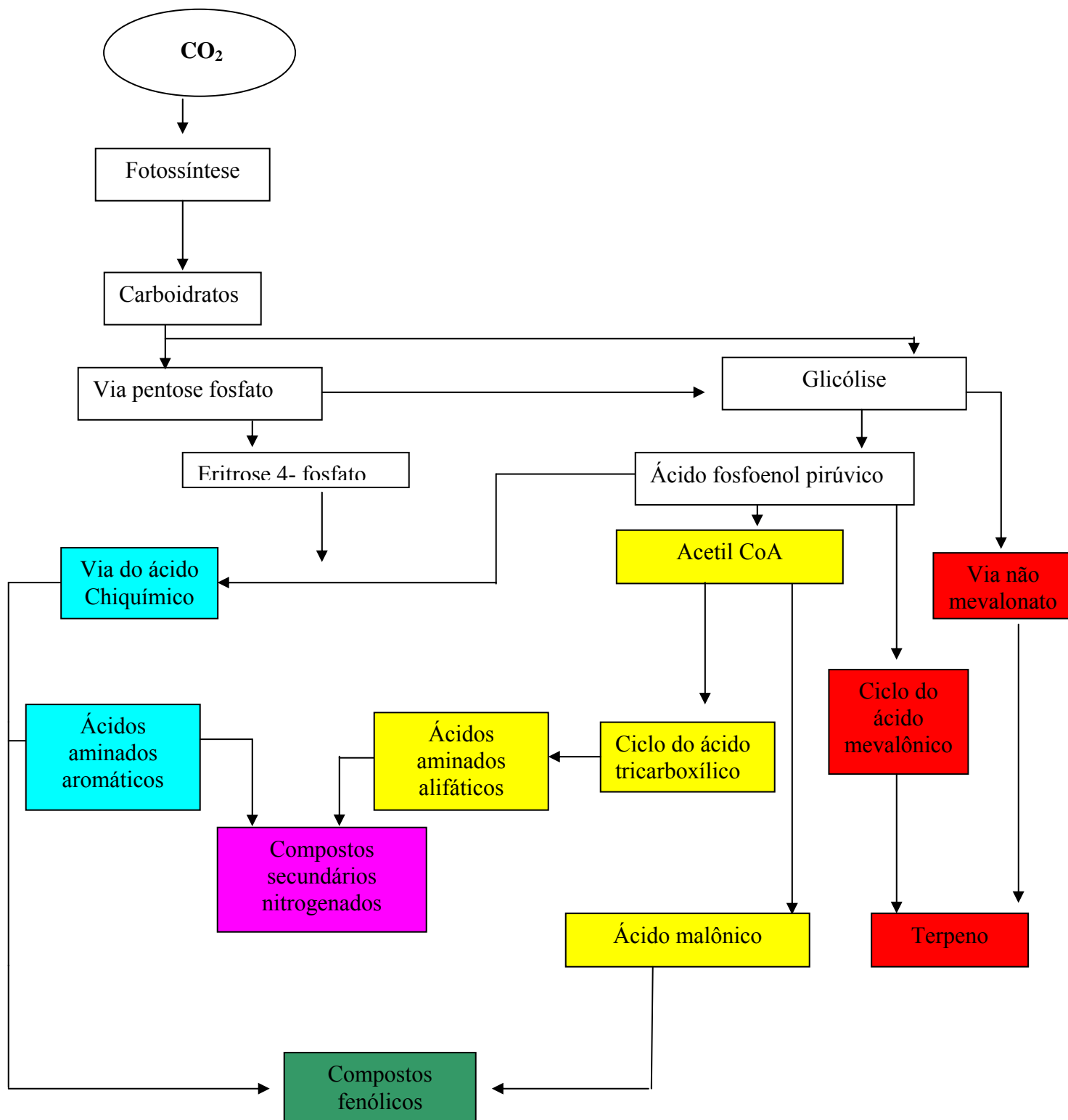
Os alcalóides são encontrados em diversos gêneros da família Euphorbiaceae, como *Croton*, *Phyllanthus* e *Securinega* (AMARAL, 1996). Inúmeros alcalóides foram descritos para o gênero *Croton*, entre eles os alcalóides taspina, alcalóides isoquinolínicos aporfinicos, proaporfinicos e diidroproaporfinicos, os alcalóides morfinanodienonicos, os alcalóides quinolínicos, os alcalóides pirrolidínicos e outros menos frequentes (AMARAL, 1996).

Esta variedade estrutural tem sido relacionada ao amplo espectro das atividades biológicas reportadas para os alcalóides. Muitos alcalóides atuam como repelente de herbívoros devido ao seu amargor e toxicidade e os seus níveis aumentam em resposta ao dano inicial provocado pela herbivoria, fortalecendo a planta contra um ataque subsequente (KARBAN *et al.*, 1997).

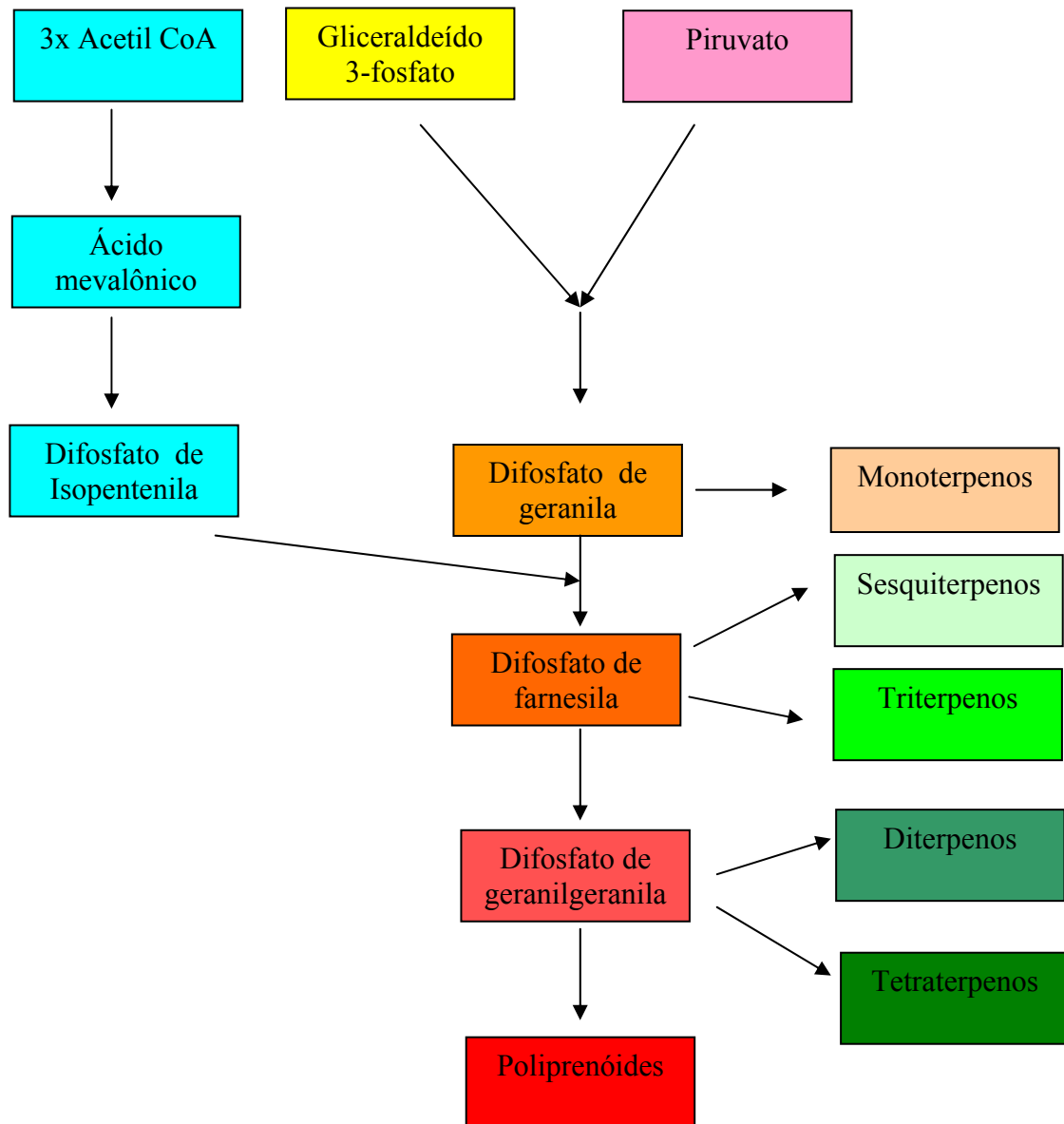
Os alcalóides proaporfinicos encontram-se distribuídos nas famílias Euphorbiaceae, Menispermataceae, Monimiaceae, Nymphaeaceae e Papaveraceae (AMARAL, 1996).

O alcalóide taspina é encontrado em poucas famílias, destacando-se entre essas, as Berberidaceae, Euphorbiaceae, Magnoliaceae. Na espécie humana os alcalóides do tipo taspina, apresentam propriedades que auxiliam a cicatrização de feridas, provavelmente devido à excitação quimioestática da migração de fibroblastos (PERSINOS *et al.*, 1969; VAISBERG *et al.*, 1989; PORRAS-REYES *et al.*, 1993). Porras-Reyes (1993), sugere que taspina estimule as fases da cicatrização de feridas, sem afetar a quimiotaxia de macrófago, a ativação de neutrófilos, a proliferação de fibroblasto e as propriedades da matriz do tecido conjuntivo. Segundo Dong (2005), o cloreto de taspina tem a habilidade de promover a cura dos ferimentos na pele de ratos, possivelmente, por estimular o crescimento de vasos capilares recém formados, além de elevar a produção de proteína colágeno no tecido próximo à ferida.

Estes alcalóides também apresentam a capacidade de inibir a enzima transcriptase reversa de retrovírus de mieloblastosis, do vírus da leucemia de Rauscherr e do vírus do sarcoma de Apes (DONG, 2005).



ESQUEMA 1: Via da formação dos Compostos Secundários. Via do Ácido Chiquímico (azul); Via do Acetato (amarelo). Ambas as vias culminam na formação dos compostos secundários e nitrogenados bem como na formação dos compostos fenólicos. Via do ácido Mevalônico, uma das vias de formação dos terpenos (vermelho). (TAIZ e ZEIGER, 2004)



ESQUEMA 2: Detalhe do ciclo dos terpenos (TAIZ & ZEIGER, 2004)

1.3 A família *Euphorbiaceae*

Entre as Angiospermas (Magnoliofita), consideradas de importância para o uso da população destacam-se as plantas da família *Euphorbiaceae*, produtora de um grande e diversificado número de compostos secundários. A família *Euphorbiaceae* pertence à ordem, *Euphorbiales* e compreende uma das mais extensas famílias das Angiospermas, abrangendo cerca de 7.500 espécies, representadas por 300 gêneros. Compreendem plantas de hábito diversificado, com representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos, aquáticos e terrestres, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1977; RANDAU *et al.*, 2004) e temperadas do planeta (WILSON, 1979).

Incluem espécies importantes na alimentação, como *Manihot esculenta* (mandioca), fonte produtora de látex para a produção de borrachas, a exemplo de *Hevea brasilienses* (seringueira), ou taxa empregados na produção de óleos utilizados na indústria de tintas e venenos (Amaral, 1996). Além desses, inúmeras espécies com forte atividade farmacológica são empregadas na medicina popular como *Phyllanthus urinaria* (quebra-pedra).

Por outro lado, o látex de algumas plantas da família *Euphorbiaceae* é tóxico e pode causar envenenamento, dermatites de contato, proliferação celular e promoção de tumor (atividade co-carcinogênica). Em muitas espécies, o látex é potencialmente tóxico e pode produzir efeitos irritantes severos, principalmente nas mucosas e olhos. Estes efeitos biológicos ocorrem pela presença de alcalóides, principalmente taspina (DESMARCHELIER, 1997), fenóis (CHEN, 1994, RANDAU *et al.*, 2004) e proantocianidina (UBILLAS, 1994, WILLIAMS, 2001), diterpenos (WILLIAMS, 2001), e ésteres de forbol no látex das espécies de *Croton*.

1.4 O gênero *Croton*

Entre os gêneros da família Euphorbiaceae com potencial uso farmacológico, destaca-se o gênero *Croton*. Segundo Pax e Hoffman, 1931 (apud MÜLLER *et al.*, 2001) o gênero *Croton* pertence à subfamília *Crotonoideae* e tribo *Crotoneae*, sendo um dos mais numerosos de Euphorbiaceae.

As espécies do gênero *Croton* têm ampla distribuição em todo o território brasileiro, estendendo-se da floresta amazônica à região Sul. Na América do Sul, as espécies do gênero ocorrem na região Amazônica da Colômbia, Equador (RISCO *et al.*, 2003), Peru (JONES, 2003) e Chile (BITTNER *et al.*, 2001).

Inúmeros nomes populares das espécies do gênero *Croton* são utilizados no território brasileiro, entre eles, destacam-se, sangue d'água, capixigui, velame e sangue de dragão, sendo este último o mais freqüente. Essa denominação se deve a liberação de látex, de coloração avermelhada, a partir do caule, quando este é seccionado. Outras plantas são também vulgarmente conhecidas pelo nome sangue de dragão, entre elas *Daemonorops draco* Brume (Palmaceae) e *Pterocarpus draco* L. (Leguminosaceae), por apresentarem látex de coloração avermelhada (JONES, 2003).

Entre as espécies de *Croton* que recebem o nome sangue de dragão estão *C. lechleri* Muell. Arg (JONES, 2003), *C. palanostigma* Klotzsch (BRAKO e ZARUCCHI, 1993), *C. erythrochilus* Muell. Arg. (PIETRS *et al.*, 1990), *C. perspicuosus* Croizat, e espécies brasileiras como *C. urucurana* Baillon, *C. macrobothrys* Baillon e *C. floribundus* Spreng.

1.5 Constituintes químicos das espécies de Croton e sua atividade biológica

As espécies de *Croton* são produtoras de grande número de alcalóides, fenilpropanóides e terpenóides (CHEN *et al.*, 1994; JONES, 2003 e RANDAU *et al.*, 2004). As espécies do gênero caracterizam-se, principalmente, por apresentarem inúmeros diterpenos (WILLIAMS, 2001), alcalóide, principalmente a taspina (DESMARCHELIER, 1997) e proantocianidinas. (UBILLAS, 1994, WILLIAMS, 2001). O látex de cor vermelha, encontrado no tronco de muitas espécies, é utilizado nas regiões da Colômbia, Equador e Peru no tratamento de feridas, úlceras, cortes e queimaduras.

Algumas espécies de *Croton* também são conhecidas por seus efeitos co-carcinogênicos e irritantes, produzindo inflamação na pele caracterizada por eritema seguido de edema, hiperplasia e conjuntivite ocular que são atribuídos, principalmente, a seus diterpenos de ésteres de forbol. Seus ésteres destacam-se por induzir a proliferação celular e a ativação de plaquetas sangüíneas. Em *Croton cajucara* constatou-se que a casca apresenta atividade gastroprotetora, antiinflamatória, hipoglicêmica e redutora de colesterol e triglicérides (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2000, MACIEL *et al.*, 2000). Recentemente, verificou-se que sementes de *C. tiglium* inibem o efeito citopático de HIV-1 (EL-MEKKAWY *et al.*, 2001) e as folhas de *C. schiedeana* reduzem a pressão arterial (GUERRERO *et al.*, 2001).

Em *Croton campestris*, *C. lechleri* e *C. urucurana* verificou-se a presença de atividade antimicrobiana (ALEXANDER *et al.*, 1991; CAI *et al.*, 1993, SILVEIRA e MC CHESNY, 1994 e PERES *et al.* 1997) e *C. lineris*, *C. echinocarpus*, *C. lechleri* e *C. floribundus* possuem ação inseticida (ALEXANDER *et al.*, 1991; CAI *et al.* 1993 e AMARAL, 1996).

Entre os produtos obtidos a partir das espécies do gênero *Croton* destaca-se o “óleo de *Croton*” que é produzido a partir da casca dos seus troncos. Esse óleo é utilizado no tratamento de sintomas gastrointestinais apresentando atividade antiúlcera (SOUZA BRITO *et al.*, 1998), gastroprotetora (HIRUMA- LIMA *et al.*, 2000), inibidora de secreções ácidas (HIRUMA- LIMA *et al.*, 2002) e atividade anticancerígena (LEGAULT *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que o óleo de *Croton* pode ocasionar dermatites de contato, a qual é mediada pelo sistema imune das células epiteliais (ZHANG *et al.*, 2000; KAMINSKI, *et al.*, 2000). A dehidrocrotonina (DCTN), um dos componentes do extrato do óleo de *Croton*, apresenta efeitos antiúlcera (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1998), especialmente úlceras por hipotermia, ligação alcoólica e ligação pilórica. Este efeito está relacionado ao aumento na liberação de prostaglandinas E2, reforçando a ação protetora da mucosa (BRITO *et al.*, 1998, HIRUMA-LIMA *et al.*, 2000).

No entanto, algumas investigações sugerem que o óleo de *Croton* pode causar carcinoma pela peroxidação dos lipídeos e produção de hidroperóxido, os quais poderiam ligar-se diretamente a proteína kinase C, estimulando repetidamente a proliferação da epiderme e induzindo a uma hiperplasia (WANG *et al.*, 2002).

1.6 Croton macrobothrys e Croton floribundus

Croton macrobothrys pertence à seção *Cyclostigma* Baill. subsect. *Cyclostigma* e compreende uma espécie arbórea, de aproximadamente 5-10 metros (Figuras 1A e 1B), latescente, com látex de coloração avermelhada (Figuras 1C e 1D). Suas folhas são ovado-lanceoladas, com cerca de 12-14 cm de comprimento e 4-6 cm de largura, pubescente na face

abaxial. É uma planta endêmica da Mata Atlântica remanescente do sul e sudeste brasileiro. Sua principal região de dispersão são os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, principalmente nas regiões serranas, estendendo-se, até os estados do Paraná e Santa Catarina. Apresenta floração em março e dezembro e frutificação em abril e janeiro.

Croton floribundus pertence à seção *Argyroglossum* Baill., também é uma planta lactescente, com látex de coloração avermelhada. Apresenta porte arbóreo, com cerca de 7- 10m de comprimento, folhas simples, alternas, lanceoladas e densamente pilosas (Figuras 73A e 73B). Também é restrita ao Brasil, na região sul e sudeste nos remanescentes da Mata Atlântica. Sua principal região de dispersão são os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, principalmente nas regiões serranas, estendendo-se, entretanto, até os estados do Paraná e Santa Catarina. Apresenta distribuição semelhante à espécie anterior, podendo, entretanto, se estender até a Argentina e Uruguai e ao Amazonas. Floresce em janeiro e fevereiro frutificando em março.

1.7 Morfologia interna do Gênero *Croton*

As primeiras descrições estruturais sobre espécies do gênero *Croton* foram realizadas por Solereder (1908), onde foram descritas características gerais do lenho e folha. Segundo Metcalfe e Chalk (1950), existe grande variação anatômica em correlação com a diversidade de habitat. As folhas de *Croton* apresentam mesófilo dorsiventral, com estômatos do tipo paracítico e os tricomas são numerosos e de formas diversas, incluindo os tipos secretor e tector. Frequentemente, são observados nectários extraflorais nos representantes da família. As células epidérmicas podem ser mucilaginosas, silicificadas, esclerificadas ou papilosas (METCALFE & CHALK, 1950).

O gênero *Croton* apresenta taxonomia complexa, em virtude do grande número de espécies, sendo freqüentes problemas com a delimitação específica (LUCENA, 1996). Estudos anatômicos centrados em espécies do gênero *Croton* são escassos. Webster *et al.* (1993) realizaram a revisão de 36 seções do gênero, auxiliando na identificação e nos estudos de ontogenia da grande diversidade morfológica do tricomas.

Uma grande variedade de tricomas foi registrada no gênero *Croton*, destacam-se dentre eles os tipos acicular, bífido ou trifido e dendrítico, com arranjo multirradiado em *C. urucurana* (ORTIZ *et al.*, 2002), tricomas escamosos nas folhas de *C. salutaris* (ORTIZ *et al.*, 2003), tricomas dendríticos em *C. compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003), unicelulares e estrelados para *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003) e finalmente tricoma glandular, denominado de célula secretora, em *C. rhamnifolius* (MENEZES *et al.*, 2003) e *Croton monanthogynus*, o qual foi denominado como célula secretora crateriforme por Metcalfe e Chalk (1965). Tricomas conectados por esclereídes foram registrados por Metcalfe e Chalk (1965) para o gênero. Esta característica também foi registrada em *C. compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003) e em *C. rhamnifolius* (MENEZES *et al.*, 2003).

A distribuição homogênea dos tricomas nas faces adaxial e abaxial da folha foi verificada em *Croton urucurana* (ORTIZ *et al.*, 2002), *C. salutaris* (ORTIZ *et al.*, 2003) e *C. compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003), sendo em *C. lanjouwensis* mais freqüentes na região apical da face abaxial folha (AGUIAR *et al.*, 2000).

Análises histoquímicas foram realizadas por Randau *et al.* (2004), as quais observaram a presença de coloração ferrugem nas células pedunculares dos tricomas de *Croton rhamnifolius* e *Croton rhamnifolioides*, identificada como compostos fenólicos.

Análises evidenciaram a presença de cristais do tipo drusa no parênquima paliçádico de fohas de *Croton matourensis* (OHANA *et al.*, 2003), *Phyllanthus niruri* (LOURO *et al.*, 2003),

Micandra inundata (BERRY *et al.*, 2004) e *Hevea brasiliensis* (THOMAS *et al.*, 1995). Também foi demonstrado que os caules primário e secundário nas espécies da família Euphorbiaceae apresentam um grande número de cristais prismáticos de oxalato de cálcio e idioblastos taníferos distribuídos de forma difusa a exemplo de *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003).

Os feixes de fibras extraxilemáticas de paredes espessadas, com pontuações são comuns em *Phyllanthus tenellus* (LOURO *et al.*, 2003), e os esclereídes e os laticíferos estão distribuídos no parênquima cortical de *Hevea brasiliensis* (THOMAS *et al.*, 1995) e *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003). Estudos sobre o lenho identificaram a presença de raios parenquimáticos uni, di e trisseriados, apresentando inclusões de grãos de amido e fibras gelatinosas (CARLQUIST, 1970; LUCHI, 2004 e MENNEGA, 2005), assim como parênquima axial apotraqueal para a subfamília *Crotonoideae* (BERRY *et al.*, 2004 e MENNEGA, 2005).

Apesar da diversidade e da importância farmacológica dos metabólitos secundários da família Euphorbiaceae, foram poucos os estudos sobre a anatomia das espécies até o momento. Visto o potencial das espécies do gênero *Croton* para fins medicinais, a localização dos metabólitos secundários produzidos por suas espécies poderá contribuir para a otimização de trabalhos fitoquímicos de purificação de compostos úteis visando uma futura aplicação. Deste modo, este trabalho visa fornecer dados sobre a estrutura de folhas e caule de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* e a localização dos principais grupos de metabólitos secundários encontrados nestas plantas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por finalidade estudar as espécies de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* a fim de identificar através de microscopia óptica, eletrônica de varredura e transmissão e testes histológicos a nível tecidual e subcelular os locais de síntese e de acúmulo de tais substâncias na folhas e caules em sucessivos estádios de desenvolvimento.

2.1 *Objetivos Específicos*

O presente trabalho tem por finalidade :

- Analisar a anatomia e ultraestrutura de folhas de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento.
- Analisar a anatomia e ultraestrutura de caules de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento
- Comparar a anatomia e ultraestrutura das duas espécies estudadas a fim de delimitar as diferenças dentro do gênero que possam auxiliar na identificação botânica
- Identificar histoquimicamente os compostos secundários produzidos e os sítios de acumulação de cada substância das espécies analisadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Coleta de Material*

Excursões foram realizadas aos municípios de Nova Friburgo e Teresópolis para a coleta de amostras de *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus*, respectivamente. Visitas periódicas foram conduzidas ao longo de vinte e quatro meses, em diferentes estações do ano a fim de observar aspectos da fenologia e biologia reprodutiva das espécies. Exemplares representativos de ambas as espécies, obtidos durante parte das excursões foram herborizados e as exsiccatas depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFRJ. Amostras de folha e caule foram fixadas no local de coleta para os estudos de anatomia e ultraestrutura.

3.2 *Material estudado*

Os estudos foram realizados em secções de folhas e caules em sucessivos estádios do desenvolvimento (tabela 01), objetivando a análise anatômica e ultraestrutural, bem como a análise dos sítios de síntese e compartimentalização dos compostos acumulados.

3.3 *Microscopia óptica*

Secções do material botânico foram fixadas imediatamente após a coleta. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5%, em tampões variados, entre eles: tampão cacodilato de sódio 0,05M, CaCl_2 50mM; tampão cacodilato de sódio 0,1M, CaCl_2 50mM; e tampão PIPES 1,25%. As amostras foram fixadas a baixo vácuo, desidratadas em série

de acetona ascendente, infiltradas e incluídas em resina Spurr. Os blocos resultantes da polimerização foram cortados em micróto (Sorvall Porter-Blum), utilizando-se navalha de vidro. Os cortes com espessura de 0,3 a 0,6 μm foram corados com solução de azul de toluidina 1 % (O'BRIEN *et al.* 1964). As amostras foram montadas em lâminas permanentes com balsamo do Canadá e visualizadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan 2 Campo Claro.

Amostras recém coletadas foram montadas em Tissue-Tek (O.C.T. Compound) e seccionadas no criostato (IEC CTF Microtome-Cryostat) à temperatura de -30°C , em secções entre 12-16 μm de espessura. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de astra e safranina. As lâminas foram montadas em glicerina 50 % e visualizadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan 2 Campo Claro.

3.4 Estudos Histoquímicos

Os estudos histoquímicos do conteúdo citoplasmático e das paredes celulares do caule e das folhas foram realizados em cortes a fresco do lenho e das folhas. As amostras foram montadas em Tissue-Tek (O.C.T. Compound) e cortadas no criostato (IEC CTF Microtome-Cryostat) à temperatura de -30°C em secções entre 12-16 μm de espessura.

3.4.1 Detecção de Amido

Para os testes de identificação de grãos de amido, as amostras foram incubadas na solução de lugol durante 5-10 minutos no escuro e em seguida lavadas em água destilada (JENSEN, 1962).

3.4.2 Detecção de lipídeos

3.4.2.1 Lipídeos totais

Para a identificação de lipídeos totais, as amostras foram incubadas em solução saturada de Sudan IV em etanol 70% por 5-10 minutos, seguida de rápida lavagem em etanol 50% e água destilada (PEARSE, 1968).

3.4.3 Detecção de Terpenos

3.4.3.1 Óleos essenciais e oleoresinas

Os óleos essenciais e oleoresinas foram identificados incubando-se as amostras com o reagente de Nadi durante 60-90 minutos no escuro. Em seguida, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2 minutos. Como controle foram empregados cortes previamente tratados por uma solução de metanol-clorofórmio (V/V) durante 1 hora a 60 °C (DAVID e CARDE, 1964).

Reagente e Nadi

Solução de α -naftol 0,1 % em etanol 40 %	0,5mL
Solução de cloridrato de dimetil-parafenileno diamina 1%	0,5mL
Tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7.2	49mL

3.4.3.2 Terpenos com o grupo carbonila

Os terpenos com o grupo carbonila foram identificados através o uso da solução saturada de 2-4 dinitrofenilhidrazina em ácido clorídrico 2N durante 10 minutos a 25 °C, seguida de lavagem em água destilada. O controle foi realizado submetendo-se secções a ação do ácido clorídrico 2N durante 10 minutos (GANTER e JOLLES, 1970).

3.4.3.3 Terpenos

Os terpenos foram identificados através do uso da solução de vanilina 1% em 50ml de etanol e 0,3mL de ácido sulfúrico. Secções do espécime foram imersas no reagente de vanilina sulfúrica e aquecidas à temperatura de 110 °C durante 3 minutos. O controle foi realizado submetendo-se as secções ao ácido sulfúrico a 0,3 % e aquecidos durante 3 minutos (SIEBERT, 2004).

3.4.4 Detecção de Substâncias Fenólicas

As substâncias fenólicas foram identificadas através do uso da solução de tricloreto de ferro a 10% por 10 minutos, seguido de lavagem em água destilada (Johanson, 1940); através de solução de dicromato de potássio a 10% durante 10 minutos seguido de lavagem em água destilada (GABE, 1968) ou através do reagente de Reeve (REEVE, 1951).

Reagente de Reeve

Nitrito de sódio	10%
Uréia	20%
Ácido acético	10%
Hidróxido de Sódio	8%

3.4.5 Detecção de Alcalóides

Os alcalóides foram identificados através do reagente de Dragendorff utilizando o método Ehera (Costa, 1982).

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise da ultraestrutura, os tecidos foram seccionados com uma lâmina de bisturi imersos em solução fixadora no próprio local de coleta e em seguida submetidas a vácuo. As amostras foram fixadas, “over night”, em paraformaldeído 4 %, glutaraldeído 2,5 %, nos tampões: cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl_2 50 mM; cacodilato de sódio 0,1 M, CaCl_2 50 mM; fosfato 0,05 M; e PIPES 1,25 %.

Posteriormente a fixação, as amostras foram lavadas na mesma solução tampão do fixador mantendo-se constante sua osmolaridade, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1 % em tampão e desidratadas em série de acetona ascendente. Posteriormente, as secções foram infiltradas e incluídas em resina Spurr (SPURR, 1969), a qual foi polimerizada a 70 °C durante 16 h. Para análise ultraestrutural, os blocos foram cortados em ultramicrotomo (super nova) utilizando navalha de diamante. Os cortes têm de 65 à 75 nm de espessura e foram recolhidos em grades de cobre de 300 mesh. A contrastação das grades foi realizada por imersão em solução de acetato de uranila 1 % em água durante 25 minutos e em solução de citrato de chumbo por 3 minutos. As grades foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS 900 EM.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura

O material coletado para microscopia eletrônica de varredura foi fixado em paraformaldeído a 4,0 %, glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,05 M, seguida do processo de lavagem na mesma solução tampão e pós-fixada em tetróxido de ósmio 1 % em solução tampão durante 1 hora. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente (50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 %) e submetidas à secagem pelo método de ponto crítico de CO₂ (BAL- TEC CPD 030) Após este processo, o material foi metalizado (BALZERS FL-9496), recebendo uma cobertura de ouro com 15 nm de espessura. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310.

Estádios	Folha	Caule
Inicial do desenvolvimento	1-2cm	1º e 2º nó
Médio do desenvolvimento	3-5cm	5º e 6º nó
Totalmente expandido	5-10cm	altura do peito

Tabela 01: *Estádios do desenvolvimento analisados*

4 RESULTADOS

4.1 *Croton macrobothrys* Baillon.

Croton macrobothrys apresenta hábito arbóreo, folhas ovalada lanceoladas pubescentes nos estádios iniciais do desenvolvimento, nectário extrafloral na base do limbo foliar (Figuras 2 e 4). O caule apresenta látex de coloração avermelhada quando seccionado (Figuras 1C e 1D).

4.1.1 *Folha*

4.1.1.1 *Epiderme*

As folhas são hipoestomáticas, com estômatos localizados ao mesmo nível das demais células epidérmicas tanto nas folhas em desenvolvimento (Figuras 3, 4, 5), quanto nas folhas totalmente expandidas (Figura 7). As células epidérmicas apresentam formato retangular e sobre a região da nervura apresentam formato alongado em sentido perpendicular às células epidérmicas que recobrem o mesófilo (Figura 6). A cutícula é lisa, formando, sobre as células anexas, estrias com arranjo perpendicular à células estomáticas (Figura 8).

Em secções transversais, as células epidérmicas de ambas as faces adaxial e abaxial são recobertas por cutícula delgada, apresentam vacúolo bem desenvolvido e citoplasma reduzido. Os plastídios formam um número reduzido de tilacóides e grana, grãos de amido e plastoglóbulos em pequenas proporções. O vacúolo acumula compostos fenólicos na região adjacente ao tonoplasto (Figura 39 e 40).

4.1.1.1.1 Ontogenia e estrutura dos tricomas tectores

As faces adaxial (Figura 11) e abaxial (Figura 12) da epiderme de folhas em estádios iniciais de desenvolvimento, são densamente pilosas. Nas folhas totalmente expandidas, a face adaxial é destituída de tricomas (Figura 6) e na face abaxial, freqüentemente observam-se tricomas do tipo estrelado (Figuras 13 e 14). O desenvolvimento dos tricomas não é sincrônico, sendo possível observar tricomas em diferentes estádios de desenvolvimento na mesma folha (Figura 26).

Em seção transversal, as folhas nos estádios iniciais do desenvolvimento apresentam duas formas de desenvolvimento de tricomas tectores. No primeiro tipo, o desenvolvimento ocorre pelo aumento de uma única célula epidérmica, que, posteriormente, divide-se de forma assimétrica em sentido periclinal (Figuras 9, 15 e 16). Em seguida, a célula apical recém formada, sofre divisões anticlinais dando origem às células radiais. Concomitantemente, a célula basal sofre novas divisões periclinais dando origem a base dos tricomas e as células subepidérmicas da região correspondente ao parênquima paliádico sofrem crescimento intrusivo, aumento de tamanho e divisões periclinais, que acompanham a formação do tricoma, preenchendo a porção interna da projeção epidérmica que dará origem ao pedicelo (Figura 19).

Após o crescimento e diferenciação, os tricomas apresentam cerca de 15-17 células radiais formando a coroa e 10-20 células que formarão o pedicelo. Neste estágio, cessam as divisões celulares, ocorrendo apenas o crescimento celular e o espessamento da parede celular (Figura 20).

O segundo tipo de desenvolvimento inicia-se com o aumento no tamanho de duas ou mais células epidérmicas, seguido de divisão celular periclinal assimétrica de ambas as células formando uma protrusão. As células formadoras da protrusão sofrem divisões anticlinais e periclinais assimétricas (Figura 18) aumentando suas dimensões. As células que compõem o raio do tricoma

sofrem aumentam e diferenciam-se apresentando um espessamento parietal. Nas folhas totalmente expandidas estes tricomas não são observados (Figura 6).

Na epiderme abaxial, o desenvolvimento dos tricomas tectores, segue os mesmos padrões observados nos tricomas da epiderme adaxial (Figuras 22 e 23). Estes tricomas caracterizam-se pela presença de intensas divisões e maior crescimento das células radiais, assim como, pela menor frequência de divisões das células basais que resultará em um pedúnculo curto (Figuras 24 e 25).

Após a intensa proliferação celular, que cessa quando o tricoma apresenta 25-30 células, inicia-se o processo de diferenciação, caracterizado pelo espessamento das paredes das células radiais (Figura 26).

A densidade de tricomas estrelados na face abaxial diminui com a expansão da lâmina foliar (Figuras 13 e 14). Neste estágio de desenvolvimento, os tricomas localizados sobre as nervuras diferenciam-se dos demais observados sobre a lâmina foliar, com raios dispostos aleatoriamente, sem a diferenciação de uma célula central, sendo classificados como tricomas multirradiados (Figura 27).

As células do pedúnculo do tricoma apresentam citoplasma denso, com vacúolo bem desenvolvido, núcleo proeminente, numerosos cloroplastos e parede externa espessa (Figura 28).

4.1.1.2 Mesofilo

O mesofilo foliar em diferenciação (Figuras 29 e 30) apresenta estrutura dorsiventral, formada por uma camada de células de parênquima paliádico e 6-7 camadas de células de parênquima lacunoso (Figuras 31, 33 e 34). O parênquima paliádico ocupa cerca de 50 % do mesofilo (Figuras 31, 33, 34 e 36) e suas células possuem o vacúolo preenchido por substâncias, que de acordo com testes histoquímicos, são de natureza fenólica (Figuras 37 A, 37B, 37C). Idioblastos

cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio, freqüentemente, encontram-se localizados entre as células do parênquima paliçádico (Figura 33). O parênquima lacunoso é formado por células de contorno isodiamétrico e, ocasionalmente, células acumuladoras de compostos fenólicos (Figura 31).

No parênquima paliçádico, das folhas em estágio inicial do desenvolvimento, as células apresentam vacúolo com substâncias eletrondensas. O citoplasma é denso e os cloroplastos são reduzidos (Figuras 43 e 44). Nas folhas totalmente expandidas, as células do parênquima paliçádico apresentam vacúolo completamente preenchido por substâncias fenólicas e citoplasma denso (Figuras 45, 46, 47 e 48). Também são observados numerosos cloroplastos contendo grande quantidade de grãos de amido, plastoglóbulos e granum diferenciados (Figuras 48, 51 e 52), assim como peroxissomo com estrutura paracristalina (Figura 50), mitocôndrias com inclusões eletrondensas e vesículas de secreção (Figura 42 e 49). O parênquima lacunoso das folhas totalmente expandidas apresenta grandes espaços intercelulares e suas células possuem paredes celulósicas finas e contorno irregular. Neste tecido, os cloroplastos apresentam numerosos grãos de amido e plastoglóbulos e o vacúolo ocupa quase todo o citoplasma (Figura 41).

Neste estágio de desenvolvimento, as folhas apresentam nectários extraflorais na base do pecíolo (Figuras 2 e 4).

4.1.2 Caule

O caule primário, em corte transversal, apresenta epiderme uniestratificada com células de contorno retangular com seu maior diâmetro no sentido periclinal, recoberta por cutícula delgada, densamente pilosa (Figura 53). As células epidérmicas apresentam citoplasma denso e vacúolo acumulando substâncias eletrondensas (Figura 65). Os tricomas são encontrados em diferentes etapas

de desenvolvimento. Quando maduros são do tipo tector estrelado, apresentando ápice multirradiado e pedúnculo multisseriado.

O parênquima cortical é caracterizado pela presença de duas regiões, a mais externa, com cerca de 15-20 camadas de células de contorno circular a poliédrico, com diâmetro reduzido, paredes celulósicas finas e espaços intercelulares reduzidos (Figura 65) e a região mais interna, onde se observa a presença de idioblastos taníferos distribuídos aleatoriamente (Figuras 54 e 55). Entre as células parenquimáticas de ambos os estratos, evidenciam-se células de conteúdo eletrondenso e granulado distribuídas aleatoriamente (Figuras 67 e 69).

Os cloroplastos das células parenquimáticas adjacentes à epiderme apresentam tilacóides pouco desenvolvidos e granum com número reduzido de tilacóides, grãos de amido ocupando grande parte do estroma e plastoglóbulos pouco freqüentes (Figura 66). As mitocôndrias e os peroxissomos apresentam distribuição aleatória e, de um modo geral, são freqüentemente observadas estruturas paracristalinas no interior nos microcorpos (Figura 71). As substâncias fenólicas, quando presentes, ocupam integralmente o vacúolo dessas células (Figura 67). Abaixo das células parenquimáticas, observa-se o início da diferenciação do tecido esclerenquimático, cujas células apresentam diâmetro reduzido, em secção transversal. Nesta fase, inicia-se a formação do espessamento parietal (Figura 54).

O sistema vascular é representado por feixes colaterais formando um anel contínuo (Figuras 53, 54 e 55). O floema é composto por elementos de tubo crivado, células companheiras distribuídas em grupos separados por células parenquimáticas. Adjacente ao floema observa-se células parenquimáticas de contorno arredondado, com menores dimensões e espaços intercelulares reduzidos. Imersos nesse tecido encontram-se laticíferos (Figura 54) com conteúdo eletrondenso.

Entre o floema e o xilema são observados três ou quatro estratos de células procambiais, com forma característica em secção transversal (Figura 56). O xilema apresenta elementos de vaso em

diferenciação, com vestígios de conteúdo citoplasmático. Entre os elementos de vaso, são observadas uma a três camadas de células parenquimáticas e esclerenquimáticas não diferenciadas, que também mantêm seu conteúdo citoplasmático (Figura 53).

Com o início do crescimento secundário (entre o quarto e quinto nó), as células epidérmicas que ainda permanecem, apresentam as mesmas características observadas no caule com crescimento primário, ou seja, contorno retangular com o maior diâmetro no sentido periclinal, sendo recobertas por cutícula espessa. Adjacente a estas células observa-se uma região de desdiferenciação das células parenquimáticas e a formação do felogênio que dará origem à periderme evidenciada por divisões periclinais (Figura 57). Nesta fase, ocasionalmente podem ocorrer na periderme, lenticelas de forma lenticular, em secção transversal, com 4-5 camadas de células oclusivas (Figura 58).

Com o desenvolvimento, a região cortical sofre aumento de tamanho, em virtude da expansão das células parenquimáticas e aumento no número de células. Nesta etapa, o número de células apresentando conteúdo eletrondenso sofre aumento, principalmente, na região mais externa do parênquima cortical (Figura 55). Os cloroplastos das células parenquimáticas apresentam grãos de amido ocupando grande parte do estroma (Figuras 67 e 68).

Entre as células parenquimáticas e floemáticas evidencia-se o início da diferenciação das fibras e esclereídes. Em secção transversal, estas células apresentam contorno triangular dispostas em feixes, formando um anel aberto (Figuras 59 e 60).

O floema, nesta fase de desenvolvimento caulinar, apresenta duas a três camadas de elementos de tubo crivado, células companheiras, célula parenquimáticas e parênquima radial unisseriado. Na região adjacente ao floema, as células parenquimáticas sofrem um colapso devido a divisões e expansões das células do floema. Nesta etapa, os laticíferos sofrem aumento, o qual é acompanhado pelo aumento no depósito de substâncias eletrondensas.

O xilema apresenta elementos de vaso solitários e múltiplos e as fibras são intercaladas por duas ou mais camadas de células do parênquima radial. O parênquima axial é do tipo apotraqueal vasicêntrico, formado por células que conservam o seu conteúdo citoplasmático.

A medula é constituída por células parenquimáticas isodiamétricas desenvolvidas. Idioblastos de conteúdo fenólico aparecem dispostos aleatoriamente nesse tecido.

No caule secundário (oitavo e nono nó), evidencia-se a presença de células do parênquima cortical com citoplasma reduzido e localizado adjacente à parede. Também são observados cloroplastos com inúmeros grãos de amido ocupando grande parte do estroma e vacúolo totalmente preenchido por substâncias eletrondensas. (Figura 69). O esclerênquima é formado por fibras e esclereídes no córtex. As fibras (Figura 70) apresentam a parede formada por 5-8 lamelas, intercalando regiões concêntricas eletrondensas com eletronlucentes e lúmen reduzido. Em geral, essas células não apresentam protoplastos vivos.

Nas células do parênquima cortical, imersos no citoplasma, são observadas numerosas vesículas de conteúdo eletrondenso próximas às regiões do tonoplasto e retículo endoplasmático localizado próximo às paredes celulares (Figura 72).

Os feixes de fibras extraxilemáticas encontram-se bem desenvolvidos neste estágio e delimitam o parênquima cortical em duas regiões, onde a região externa é formada por células menores e a região mais interna por células parenquimáticas com maior diâmetro. As células parenquimáticas possuem protoplasto reduzido, cloroplastos com inúmeros grãos de amido e vacúolo completamente preenchido por substâncias eletrondensas características de compostos fenólicos.

No caule secundário (figura 55) à cerca de 1,5m do solo, a periderme é formada por 20 - 30 camadas de células (Figura 57), sendo o felema constituído por células com paredes espessas e contorno retangular, quando observado em cortes transversais. A feloderme é formada por células

isodiamétricas que, ocasionalmente, podem acumular compostos fenólicos em seu vacúolo. As células do parênquima cortical são isodiamétricas e freqüentemente, apresentam depósitos de fenólicos. Imersos neste tecido são observadas inúmeras fibras extraxilemáticas de paredes espessas e lúmen reduzido, arranjadas em pequenos feixes (Figura 59).

Entre as células esclerenquimáticas e a periderme e na região correspondente ao floema primário, encontram-se os laticíferos, constituídos por células que em secções longitudinais são alongadas no sentido do maior eixo da planta (Figura 60).

O sistema vascular é representado por células de floema com paredes finas e contorno e dimensões irregulares, os extratos cambiais são constituídos por três camadas de paredes finas e o xilema secundário apresenta poros solitários e múltiplos. O parênquima axial é apotraqueal e os raios parenquimáticos são uniseriados e heterogêneos, com células apresentando conteúdo amilífero.

4.1.3 Testes histoquímicos

4.1.3.1 Folha

Análises histoquímicas realizadas em folhas em estádios iniciais do desenvolvimento evidenciaram o acúmulo de substâncias fenólicas nos tricomas e em células do parênquima paliçádico.

Nos tricomas tectores, de ambas as faces, as células radiais e do pedúnculo mostraram intensa marcação para substâncias fenólicas identificadas pela reação de dicromato de potássio (Figuras 35A e 35C). O acúmulo destas substâncias é maior nas células do raio quando comparadas com as do pedúnculo.

Nos tricomas tectores, nas células epidérmicas ordinárias e nas células correspondentes a região do parênquima cortical das nervuras central e nervuras secundárias apresentam acúmulo de substâncias fenólicas evidenciadas pelos reagentes de cloreto férrico e Reeve respectivamente (figuras 35B, 35D e 35E). Observam-se ainda, idioblastos taníferos adjacentes ao floema e entre os feixes vasculares que compõe o tecido vascular da nervura central (Figura 35 D e 35E).

Na folha totalmente expandida após a destituição parcial dos tricomas observa-se padrão diferenciado dos sítios de acumulação dos compostos fenólicos. Nesse estágio de desenvolvimento um grande acúmulo de tais substâncias é evidenciado pelas reações de cloreto férrico (Figura 37A) e dicromato de potássio (Figura 37B) nas células epidérmicas da face abaxial e ao longo das células do parênquima paliçádico.

Na cutícula, das células epidérmicas de ambas as faces adaxial e abaxial, das folhas completamente expandidas, observa-se deposição de substâncias lipídicas evidenciadas pela reação de Sudan IV (Figura 37 D e 37E). Entre as células epidérmicas, verifica-se a presença glândulas crateriformes que apresentam conteúdo lipídico evidenciado pelo Sudan IV, com distribuídos aleatoriamente (Figura 37E).

Nas folhas totalmente expandidas, a nervura central apresenta conteúdo fenólico nas células epidérmicas, no colênquima, em idioblastos distribuídos randomicamente na região correspondente ao parênquima cortical e próximo aos feixes vasculares. Esta localização foi identificada pelas histoquímicas de cloreto férrico, dicromato de potássio e Reeve (Figuras 38 A, 38B e 38C). Análises comparativas entre as nervuras, em ambas as faces de desenvolvimento foliar demonstram o decréscimo no número de células acumuladoras de substâncias fenólicas.

4.1.3.2 *Caule*

Testes histoquímicos no caule em desenvolvimento evidenciaram a presença de diferentes compostos na região da periderme e do parênquima cortical. Secções transversais do caule, revelaram nas células da periderme, nas células da região mais externa do parênquima cortical e em idioblastos distribuídos adjacentes a região floemática, a presença de acúmulo de substâncias fenólicas, evidenciadas pelas reações de dicromato de potássio e Reeve, (Figuras 63A, 63B e 64A). Maior acúmulo de terpenos foi evidenciado através do teste de vanilina sulfúrica nas células periféricas do parênquima cortical e em idioblastos distribuídos aleatoriamente na região mais interna do parênquima (Figura 64E). Gotículas lipídicas distribuídas de forma escassa no interior das células do parênquima cortical foram evidenciadas pela reação de Sudan IV (Figura 63C). A presença de amido foi identificada na periderme e em poucas células do parênquima cortical (Figura 64D).

Em secções transversais do caule identificaram-se depósitos de substâncias fenólicas através das reações de dicromato de potássio e cloreto férrico na região da periderme (Figura 62A) e no parênquima cortical (Figura 62B). Observa-se em ambos os estádios do desenvolvimento do caule a periderme e parênquima cortical como os sítios de biossíntese e acúmulo de substâncias fenólicas. Secções longitudinais do caule secundário evidenciam que laticíferos não articulados, distribuídos no parênquima cortical próximo ao floema, apresentam conteúdo de coloração avermelhada, evidenciado pelo reagente de Sudan IV como substâncias lipídicas (Figura 61).

4.2 *Croton floribundus* Spreng

Croton floribundus apresenta porte arbóreo, folhas alternas lanceoladas, densamente pilosas em todos os estádios do desenvolvimento e inflorescência terminal (Figuras 73A e 73B). O caule apresenta látex de coloração avermelhada, característica da espécie.

4.2.1 Folha

4.2.1.1 Epiderme

Nos estádios iniciais de desenvolvimento as folhas são densamente pilosas em ambas as faces adaxial (Figura 74 e 75) e abaxial (Figura 80 e 81). A lâmina foliar apresenta epiderme unisseriada, formada por células de contorno retangular com seu maior diâmetro no sentido periclinal, recobertas por cutícula delgada. As células epidérmicas de ambas as faces adaxial e abaxial apresentam citoplasma denso, numerosos plastídios sem diferenciação de tilacóides em granum e o início do depósito de substâncias eletrondensas no vacúolo (Figuras 109 e 110). O aparelho estomático, nas folhas jovens não é diferenciado e nas folhas desenvolvidas são do tipo paracítico (Figura 83).

Nas folhas totalmente expandidas a contínua divisão das células epidérmicas e a perda de inúmeros tricomas resultam na redução do número de tricomas (Figura 76 e 77). Nas folhas totalmente expandidas, a epiderme adaxial é revestida por tricomas dos tipos acicular (Figura 78) e multirradiado (Figura 79), enquanto na face abaxial são encontrados tricomas do tipo lepdote (Figura 82) e o tipo glandular (Figura 90).

4.2.1.1.1 Ontogenia e estrutura dos tricomas tectores

O desenvolvimento dos tricomas é assincrônico, podendo ser observado em uma mesma folha em diferentes estádios de diferenciação (Figura 86). Secções transversais da folha, em estádios iniciais do desenvolvimento evidenciam dois tipos de tricomas tectores, acicular (Figura 89) e lepdote (Figura 93).

O tipo acicular é multicelular, multisseriado, apresentando célula central diferenciada e células adjacentes restritas a região da base (Figura 89). Apresenta a região apical composta por uma célula apical com paredes espessadas e as células circundantes, que não formam um pedúnculo distinto, com impregnação de substâncias eletrondensas (Figura 88).

O tipo lepdote é formado por uma região apical multirradiada e um pedúnculo multisseriado (Figura 93). Este tricoma é composto por uma região apical formada por 12-14 células e um pedúnculo longo com aproximadamente 25-30 células (Figura 93).

Na epiderme adaxial os tricomas tectores são do tipo acicular, sendo mais freqüentes durante as fases iniciais de desenvolvimento da folha (Figura 87). Estes tricomas originam-se a partir de uma célula epidérmica que, inicialmente, sofre um aumento gradual (Figura 84) e, posteriormente, sofre uma divisão periclinal, dando origem a duas células filhas, onde a célula apical sofrerá um aumento de tamanho no eixo vertical, formando a célula apical central (Figura 85) e diferenciada das demais adjacentes (Figura 87). A célula basal sofre divisões periclinais e anticlinais, aumentando o número nesta região. Durante o desenvolvimento do tricoma, estas células envolverão a região basal da célula apical (Figura 86).

Ao final do desenvolvimento, a diferença nos padrões de divisão e crescimento das células da epiderme e do tricoma dão origem a uma região de constrição entre o tricoma e as células

epidérmicas (Figura 89). Frequentemente, a célula central apical sofre espessamento da parede (Figuras 87 e 88).

No processo de diferenciação dos tricomas, as células parenquimáticas subepidérmicas contribuem para a formação do pedicelo e parte das células que compõem os raios (Figura 86).

A origem do tricoma tector do tipo lepdote, ocorre através de duas formas de desenvolvimento. No primeiro caso, as células epidérmicas sofrem aumento e, posteriormente, dividem-se sincronicamente no sentido periclinal originando uma protrusão na epiderme. Estas células sofrem sucessivas divisões no plano anticlinal, dando origem ao tricoma. As células subepidérmicas, na região correspondente ao parênquima paliçádico, através de um crescimento intrusivo, acompanham a formação do tricoma dando origem à parte interna do pedúnculo e as células radiais do tricoma (Figura 93). As células epidérmicas irão formar a região externa do pedicelo e parte das células radiais (Figura 92).

No segundo caso, uma célula epidérmica sofre aumento (Figura 90) e inicia o desenvolvimento do tricoma, formando uma única célula apical diferenciada (Figura 91). Sucessivas divisões anticlinais promovem o aumento do eixo vertical do tricoma. Após o estágio de 15-17 células, as células radiais do tricoma sofrem um aumento em sua porção apical, conferindo o aspecto radiado final (Figura 93). As células epidérmicas adjacentes à célula apical darão origem às ramificações laterais do tricoma tector, evidenciando o tipo lepdote.

Na fase final de desenvolvimento, as paredes das células do pedúnculo e do raio são fortemente espessadas (Figuras 100, 103 e 104).

Durante o desenvolvimento da lâmina foliar, parte das células correspondentes aos parênquimas paliçádico e lacunoso adjacentes aos tricomas e localizados entre os tricomas aciculares e lepdote da face adaxial e abaxial, diferenciam-se formando esclereídes colunares que mantêm uma ligação entre estes dois tricomas (Figuras 95 e 96).

As células epidérmicas que dão origem aos tricomas apresentam um padrão de divisão diferenciado (Figura 117), embora a sua organização ultraestrutural seja semelhante às demais células epidérmicas. Nas células formadoras dos tricomas, ocorre um início de espessamento parietal (Figura 118). Posteriormente a esta fase, ocorre a perda do conteúdo citoplasmático e a degeneração das organelas, a exemplo dos plastos e mitocôndrias (Figuras 119 e 120).

Nas folhas totalmente desenvolvidas, as esclereídes agrupam-se em feixes e apresentam citoplasma com lúmen reduzido e pontuação simples (Figuras 125 e 126). Nestas folhas, as células parenquimáticas, adjacentes às esclereídes diferenciadas, perdem o seu conteúdo citoplasmático (Figuras 121 e 124) e, ocasionalmente, acumulam conteúdo eletrondenso no interior do vacúolo (Figuras 122 e 123).

4.2.1.1.2 Tricoma Glandular

O tricoma glandular é unicelular apresentando grandes dimensões na base e região apical constrita (Figura 94). Os tricomas glandulares estão restritos a face abaxial da epiderme em ambos os estádios do desenvolvimento. A célula inicial do tricoma tem origem epidérmica que aumenta em tamanho iniciando, posteriormente, o processo de armazenamento de substâncias no interior do vacúolo (Figura 107 e 108).

As paredes externas das células dos tricomas glandulares são delgadas, quando comparadas com as paredes espessadas dos tricomas tectores (Figura 107).

4.2.1.2 Mesofilo

As folhas jovens, com 1-2 cm de comprimento apresentam região parenquimática indiferenciada (Figuras 111, 127 e 129), composta por 5-6 estratos celulares. No parênquima clorofiliano, células do parênquima paliçádico e grande parte das células do parênquima lacunoso acumulam substâncias eletrondensas (Figuras 129 e 130). Neste estágio, os cloroplastos do parênquima paliçádico acumulam grãos de amido e não apresentam diferenciação dos tilacóides (Figuras 131 e 132). Durante o desenvolvimento (folhas com 4-5 cm de comprimento), são freqüentemente observadas vesículas contendo substâncias eletrondensas adjacentes à parede celular (Figuras 137 e 138).

Folhas totalmente expandidas apresentam um padrão dorsiventral, mesofilo composto por um estrato de células paliçádicas de contorno retangular, sendo o seu maior eixo no plano anticlinal (Figura 112) e tecido esponjoso composto de 2-3 camadas de células de contorno isodiamétrico (Figura 114). Entre as células do parênquima paliçádico observa-se a presença de idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio (Figuras 115 e 116).

As células do parênquima clorofiliano das folhas totalmente expandidas apresentam citoplasma reduzido, numerosos cloroplastos com grãos de amido e plastoglobulos ocupando grande parte do estroma (Figuras 133 e 134) e vacúolo completamente impregnado de substâncias eletrondensas (Figuras 135 e 136). Com o desenvolvimento foliar, há um aumento no número e dimensões dos grãos de amido e dos plastoglóbulo nos cloroplastos parênquima paliçádico (Figura 134), assim como na quantidade de substâncias eletrondensas acumuladas nos vacúolos (Figura 135).

As células do tecido esponjoso apresentam numerosos cloroplastos contendo inclusões de grãos de amido menores do que os observados no parênquima paliçádico (Figura 128).

4.2.2 *Caule*

O caule primário, em corte transversal, apresenta epiderme uniestratificada, com células de contorno retangular (Figura 139). O parênquima cortical apresenta-se dividido em duas regiões, a primeira, adjacente a região epidérmica, possui cerca de 13-15 camadas de células de diâmetro reduzido e contorno circular, paredes celulósicas finas e espaços intercelulares reduzidos. Células contendo substâncias eletrondensas no vacúolo são aleatoriamente encontradas neste tecido. Também são observados cloroplastos com numerosos grãos de amido no estroma (Figuras 158 e 159). A segunda camada celular caracteriza-se pela formação de células parenquimáticas com maior diâmetro.

O sistema vascular é representado por feixes colaterais formando um anel contínuo. O floema é composto por células características distribuídas em grupos. O raio apresenta-se diferenciado, acumulando compostos fenólicos. Adjacentes ao floema são observadas células parenquimáticas isodiamétricas apresentando grandes dimensões. Laticíferos com conteúdo eletrondenso são observados neste tecido (Figura 142).

O caule apresenta desdiferenciação das células epidérmicas e formação do felogênio. A periderme recém formada através de divisões periclinais, é constituída por células impregnadas de substâncias eletrondensas (Figura 140).

Com o desenvolvimento caulinar, a região cortical sofre um aumento quanto ao volume e número de células parenquimáticas. Nesta etapa, o número de células apresentando conteúdo eletrondenso é maior, principalmente na região periférica do parênquima cortical (Figura 144). Na região cortical são formados feixes de fibras extraxilemáticas caracterizadas pela presença de lúmen reduzido (Figura 141), início do espessamento da parede e perda do conteúdo citoplasmático (Figuras 146 e 147). As células parenquimáticas apresentam acúmulo de substâncias eletrondensas

no vacúolo e cloroplastos reduzidos com grãos de amido ocupando grande parte do estroma (Figuras 160 e 161)

O xilema é formado por elementos de vasos solitários ou agrupados que podem conservar o conteúdo eletrondenso, assim como, fibras libriformes e fibras gelatinosas (Figuras 143 e 157). O parênquima radial acumula substâncias eletrondensas (Figura 142) que, de acordo com os testes histoquímicos com o reagente de Reeve, evidenciaram tratar-se de compostos fenólicos (Figura 148B).

O caule secundário apresenta parênquima cortical constituído por células de contorno isodiamétrico a poliédricas ocasionalmente impregnadas de substâncias eletrondensas (Figuras 139 e 140), as quais formam espaços intercelulares reduzidos. Nessas células, freqüentemente é observado a presença de grãos de amido (Figuras 153 e 154) e idioblastos contendo drusas de oxalato cálcio (Figuras 155 e 156). Neste tecido são observados feixes de fibras extraxilemáticas, apresentando paredes espessas e lúmen reduzido (Figuras 162 e 163).

4.2.3 Testes Histoquímicos

4.2.3.1 Folha

Testes histoquímicos realizados em folha,s em estádios iniciais do desenvolvimento, evidenciaram o acúmulo de substâncias fenólicas nos tricomas tectores e glandulares, em células do parênquima lacunoso e substâncias lipídicas nos tricomas glandulares.

Nas células apicais dos tricomas glandulares nos estádios iniciais do desenvolvimento observa-se acúmulo de substâncias fenólicas evidenciadas pela reação de cloreto férrico (Figura

99A), de amido evidenciado pela reação com lugol (Figura 99B) e intensa marcação para substâncias lipídicas evidenciada pela reação com Sudan IV (Figura 101A).

As células epidérmicas ordinárias, as células do pedúnculo e do raio dos tricomas, assim como as células do parênquima paliádico e lacunoso de folhas totalmente expandidas apresentam intensa marcação para substâncias fenólicas evidenciadas pelas reações de Reeve (Figura 102A) e cloreto férrico (Figura 102B).

Testes histoquímicos realizados em folhas completamente expandidas, utilizando cloreto férrico, evidenciaram a presença de substâncias fenólicas acumuladas preferencialmente nas células do parênquima lacunoso (Figura 115).

4.2.3.2 Caule

Testes histoquímicos do caule secundário evidenciaram a presença de substâncias diferentes na periderme e parênquima cortical. Em secções transversais do caule observou-se através da reação de cloreto férrico e do reagente de dicromato de potássio intensa marcação de substâncias fenólicas na região do parênquima cortical (Figuras 150A, 150B e 151A) e na periderme (Figura 149C) (Figura 152B). Idioblastos com conteúdo fenólico distribuídos randomicamente no parênquima cortical e na região próxima do floema foram evidenciados pelo reagente de dicromato de potássio (Figuras 149A e 149 B). A presença de substâncias de natureza lipídica foi evidenciada nas células do parênquima cortical (Figura 150C) e na cutícula sobre as células epidérmicas (Figura 151C) através de testes com Sudan IV. Grãos de amido foram evidenciados nas células do parênquima cortical através da reação de Lugol (Figura 154). As células da periderme acumulam alcalóides (Figuras 151D e 152A) de acordo com os testes realizados com o reagente de Dragendorff. A presença de terpenos foi identificada nos laticíferos através do reagente de 2-4 dinitrofenilhidrazina

(Figura 151B) e no parênquima cortical e periderme pela reação de Vanilina Sulfúrica (Figura 148A). Evidenciou-se a presença de substâncias fenólicas no raio do xilema pela reação com reagente de Reeve (Figura 148B).

<i>Testes Histoquímicos</i>	<i>Croton macrobothrys</i>	<i>Croton floribundus</i>
Detecção de substâncias fenólicas -Reeve	Positivo nos tricomas e nas células do parênquima paliçádico e idioblastos dispersos randomicamente na nervura	Positivo nos tricomas tectores e nas células epidérmicas
Detecção de substâncias fenólicas Cloreto Férrico	Positivo nos tricomas, células epidérmicas da face abaxial da folha adulta e nas células do parênquima paliçádico idioblastos dispersos randomicamente na nervura	Positivo nos tricomas tectores e glandulares e na região do parênquima paliçádico e parênquima lacunoso
Detecção de substâncias fenólicas Dicromato de Potássio	Positivo nos tricomas e na nervura na região correspondente do parênquima cortical e em idioblastos dispersos randomicamente na nervura	Positivo nos tricomas tectores e no parênquima paliçádico
Lugol- Detecção de amido	Negativo	Positivo nos tricomas glandulares
Sudan IV- detecção de lipídeos	Positivo na região da cutícula e glândula crateriforme	Positivo nos tricomas glandulares

Tabela 02: *Testes histoquímicos em folhas*

<i>Testes Histoquímicos</i>	<i>Croton macrobothrys</i>	<i>Croton floribundus</i>
<i>Detecção de substâncias fenólicas -Reeve</i>	<i>Periderme Idioblastos no parênquima cortical</i>	<i>Raio do Xilema</i>
<i>Detecção de substâncias fenólicas Cloreto Férrico</i>	<i>Periderme Idioblastos no parênquima cortical</i>	<i>Periderme Idioblastos no parênquima cortical</i>
<i>Detecção de substâncias fenólicas Dicromato de Potássio</i>	<i>Periderme Idioblastos no parênquima cortical</i>	<i>Periderme Idioblastos no parênquima cortical</i>
<i>Detecção de amido- Lugol</i>	<i>Periderme Parênquima cortical</i>	<i>Grãos de amido nas células do parênquima cortical</i>
<i>Detecção de terpenos- 2,4 dinitrofenilhidrazina</i>		<i>Laticíferos</i>
<i>Detecção de terpenos- Vanilina Sulfúrica</i>	<i>Periderme Parênquima cortical</i>	<i>Periderme Parênquima cortical</i>
<i>Determinação de alcalóides- Dragendorff</i>		<i>Periderme</i>
<i>Detecção de lipídeos- Sudan IV</i>	<i>Gotículas no parênquima cortical Laticíferos</i>	<i>Gotículas no parênquima cortical Cutícula</i>

Tabela 03: Testes histoquímicos em caule



Figura 1A-1B- Fotografia de *Croton macrobothrys* Baillon. Fig. 1A- *Habitus*. Fig. 1B- detalhe da Inflorescência.



Figuras 1C-1D – Fotografia do caule de *Croton macrobothrys*. Fig. 1C e 1D- Detalhe do látex de coloração vermelha liberado quando o caule é seccionado.

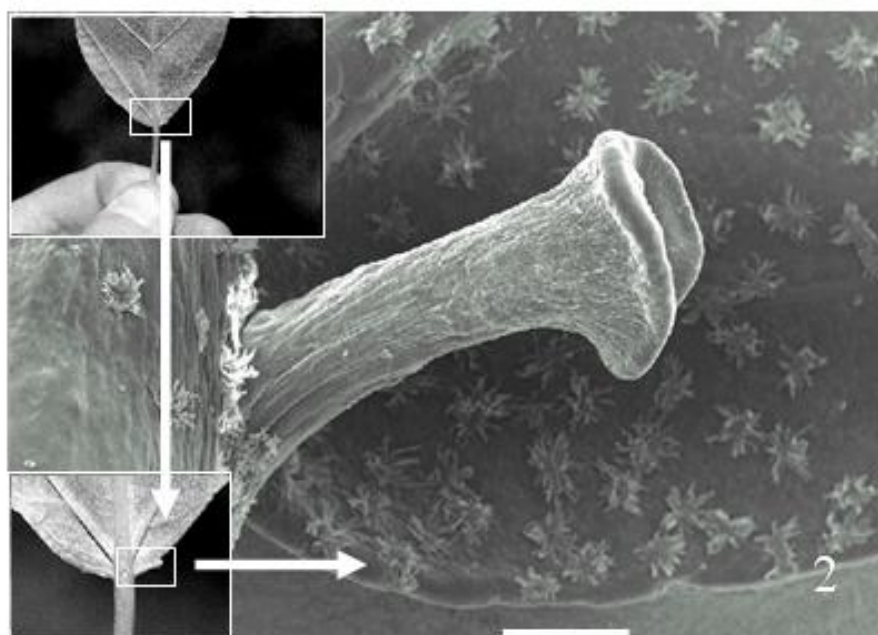
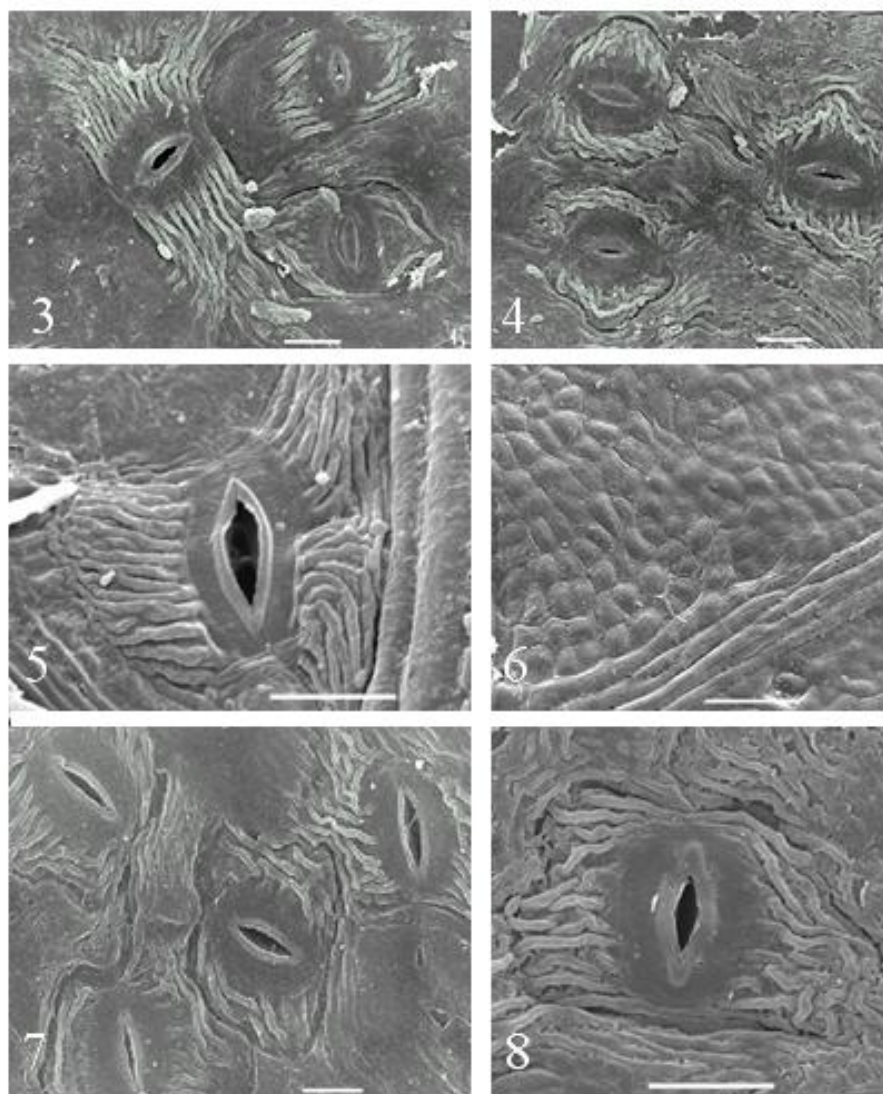
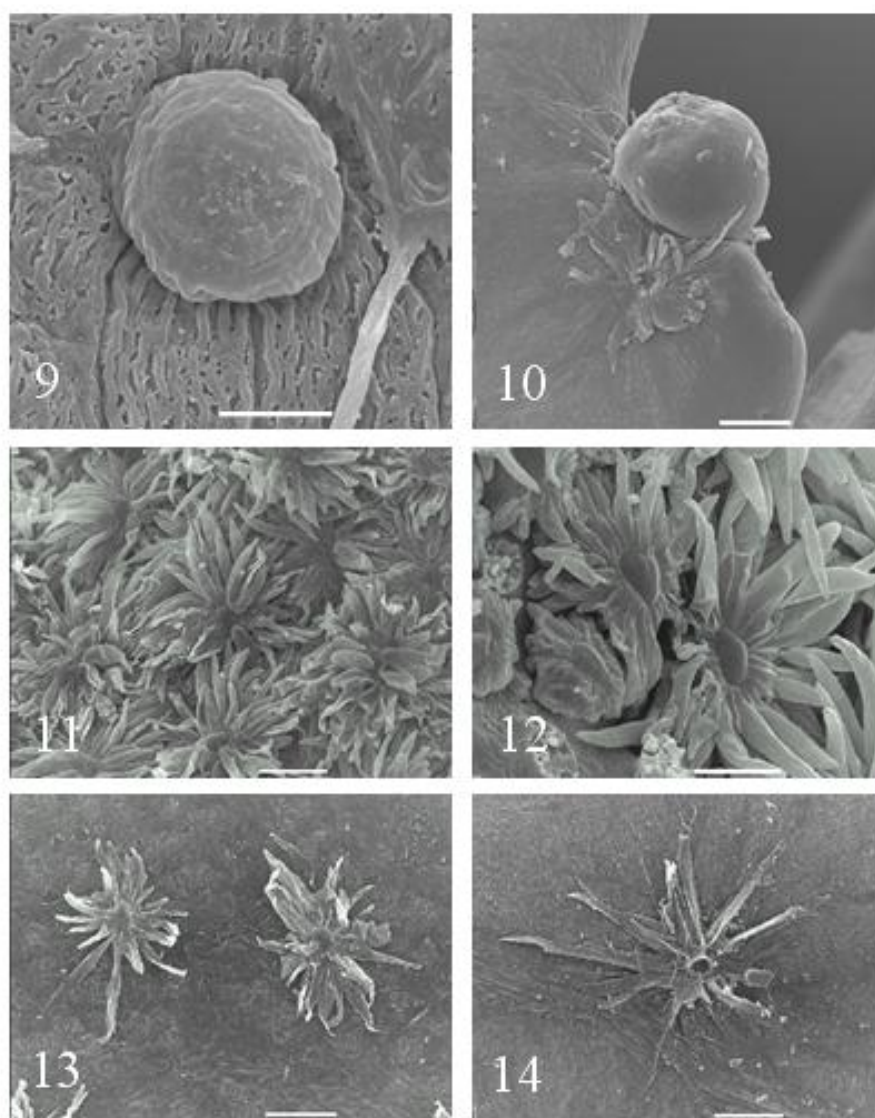


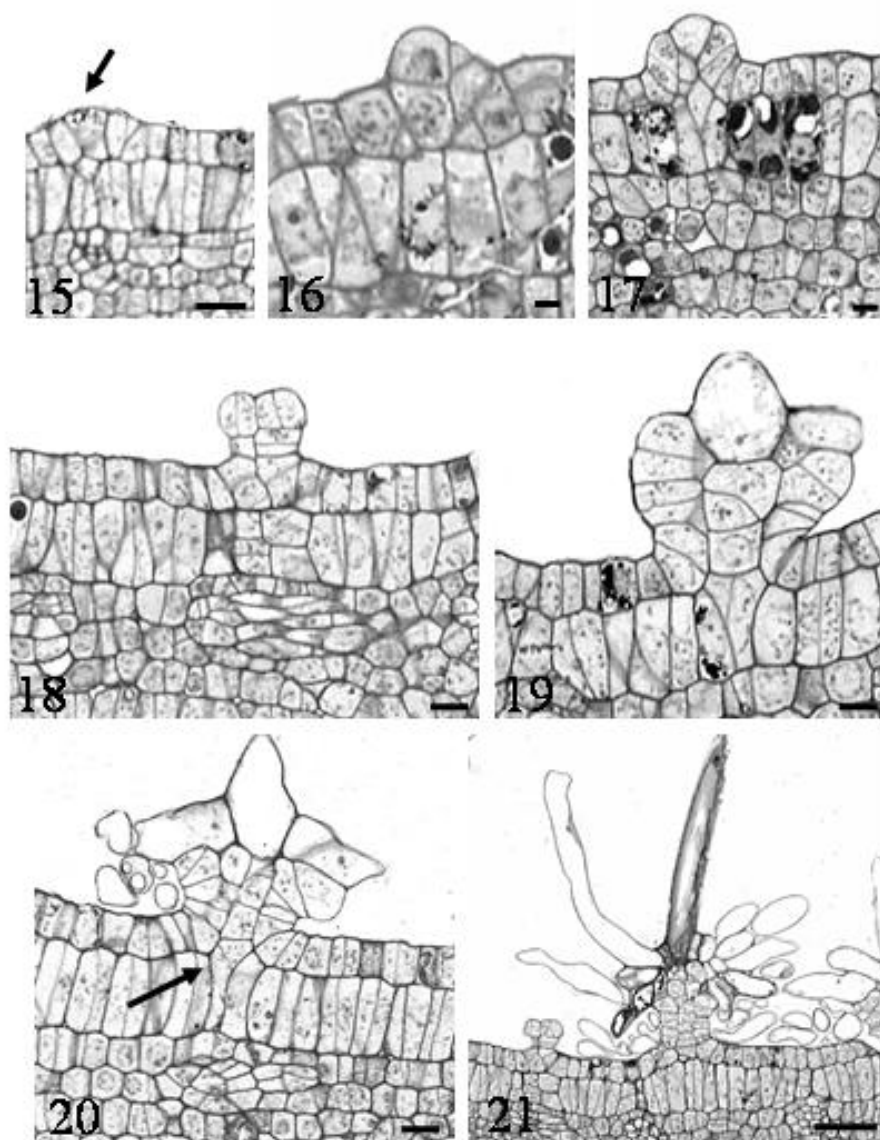
Figura 2- Microscopia eletrônica de varredura da folha de *Croton macrothyrs*. Fig. 2
-Detalhe do nectário extrafloral na base foliar barra = 500µm.



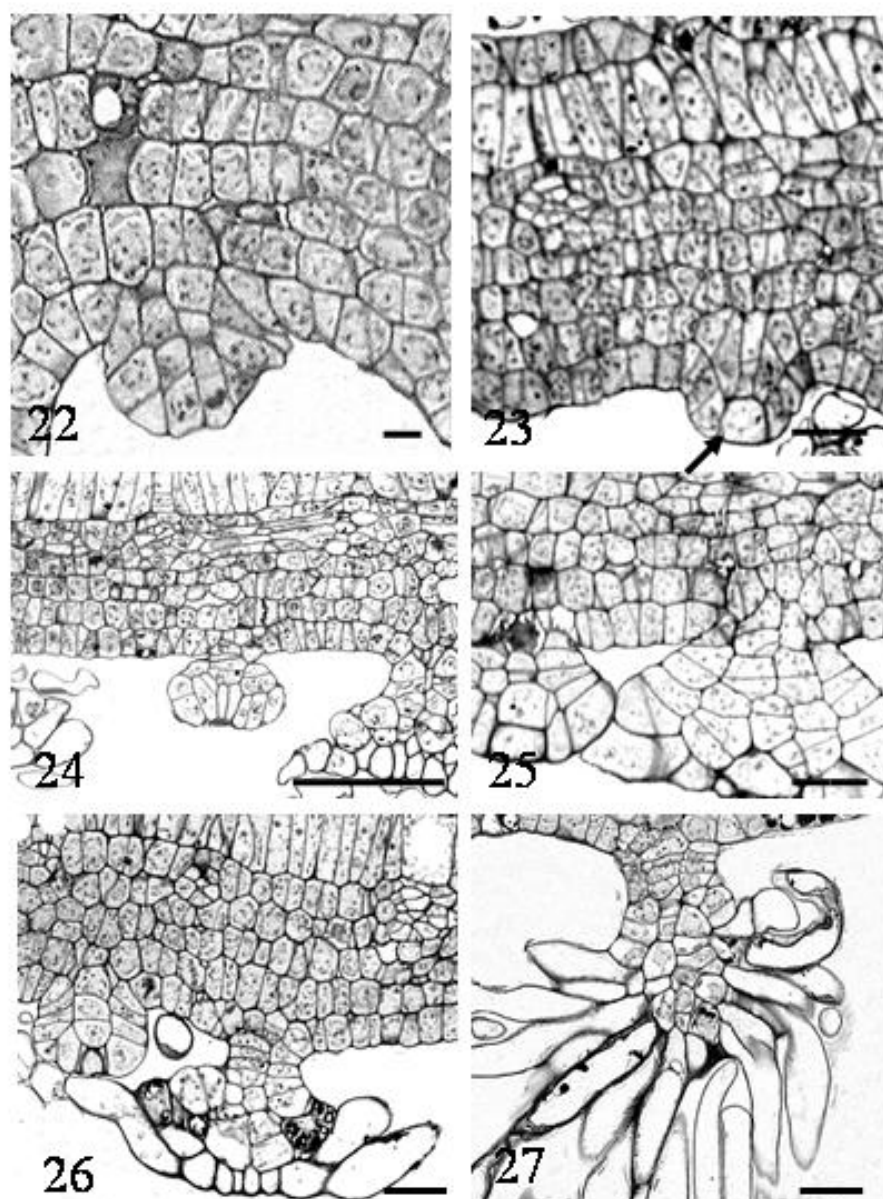
Figuras 3-8 - Microscopia eletrônica de varredura dos estômatos de *Croton macrobothrys*. Fig. 3, 4 e 5- Epiderme abaxial de folha em desenvolvimento. Fig. 6- Células epidérmicas da face adaxial da folha jovem. Fig. 7 e 8- Epiderme abaxial da folha adulta evidenciando estrias espiritculares. Figuras 3,4,5,7,8 barra = 10 μ m, Figura 6 barra = 50 μ m.



Figuras 9-14 - Microscopia eletrônica de varredura dos tricomas da folha em diferentes estádios do desenvolvimento de *Croton macrobothrys*. Fig. 9- Protrusão epidérmica da face adaxial da folha jovem, indicando ser o início do desenvolvimento de um tricoma tector. Fig. 10- Nectário extrafloral em formação. Fig. 11- Tricoma estrelado da face adaxial de uma folha jovem. Fig. 12- Detalhe do tricoma estrelado da epiderme abaxial da folha jovem. Fig. 13- Tricoma estrelado da epiderme abaxial da folha em desenvolvimento. Fig. 14- Tricoma estrelado da epiderme abaxial da folha totalmente expandida. Figura 9 barra = 10 µm, Figuras 10, 11, 13, 14 barra = 100 µm, Figura 12 barra = 50 µm.



Figuras 15-21 – Microscopia óptica de campo claro mostrando a ontogênese dos tricomas da epiderme adaxial de *Croton macrobothrys*. Fig. 15- Início da formação do tricoma, protusão epidérmica (seta). Fig. 16- Célula epidérmica com dimensões aumentadas. Fig. 17- protusão epidérmica, evidenciando início da diferenciação da célula apical. Fig. 18- desenvolvimento assincrônico do tricoma. Fig. 19 e 20- Tricoma dendrítico, folha jovem (seta), mostrando invaginação das células subepidérmicas para a região do pedúnculo. Fig. 21- detalhe do tricoma estrelado da folha adulta. Figuras 15-21 barra= 10 μ m.



Figuras 22-27 - Microscopia óptica de campo claro mostrando a ontogênese dos tricomas da epiderme abaxial de *Croton macrobotrys*. Fig. 22- início da desenvolvimento sincrônico do tricoma. Fig. 23- protrusão epidérmica, evidenciando início de diferenciação da célula apical (seta). Fig. 24 e 25- Detalhe da folha no estágio intermediário do desenvolvimento, evidenciando a constrição na base do tricoma estrelado. Fig. 26- Tricoma estrelado, evidenciando pedúnculo pouco desenvolvido. Fig. 27- Detalhe do tricoma multirradiado da região da nervura. Figuras 22-27 barra= 10 μ m.

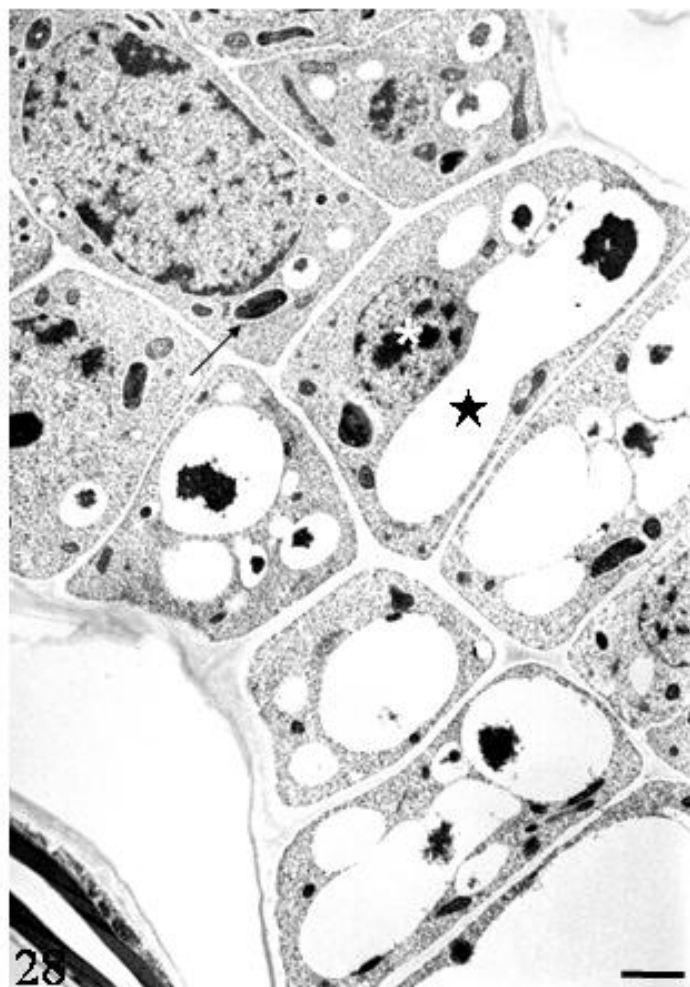
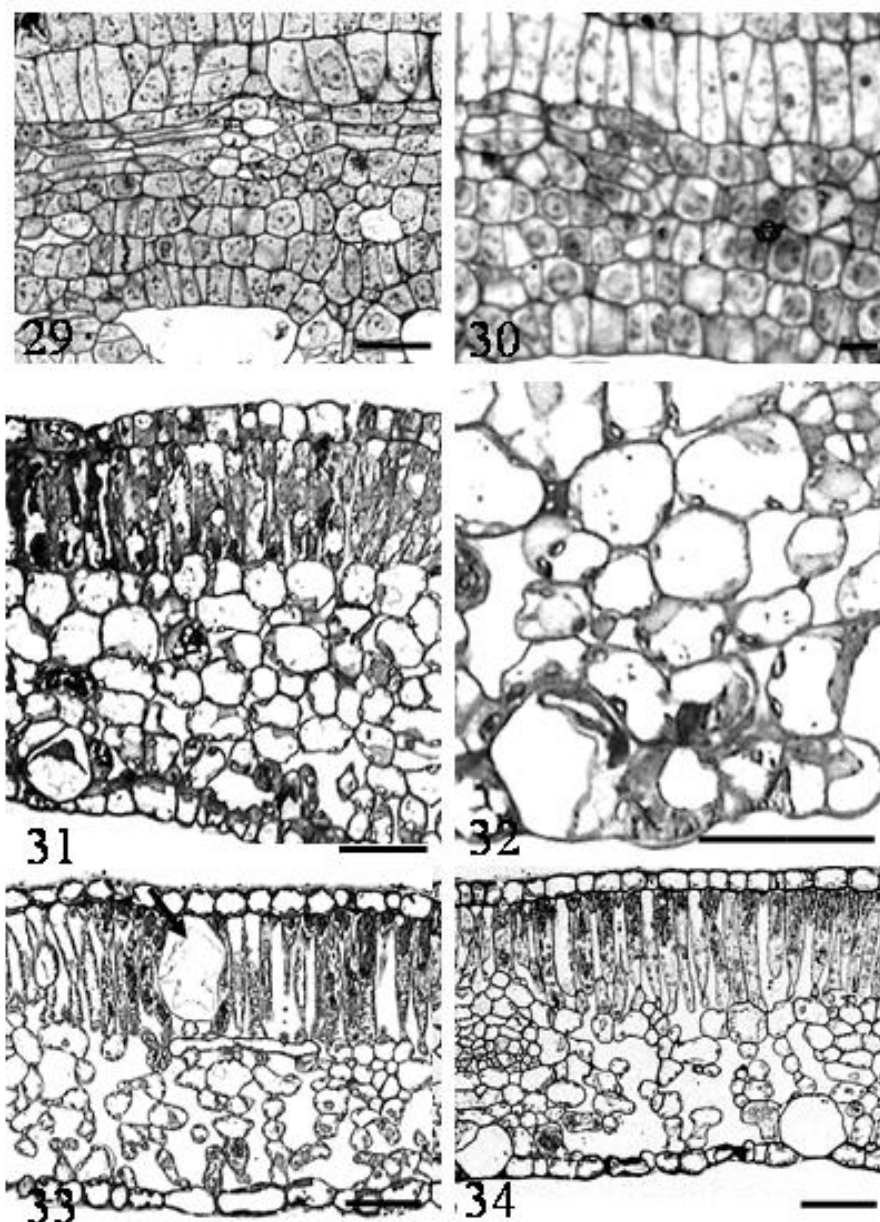
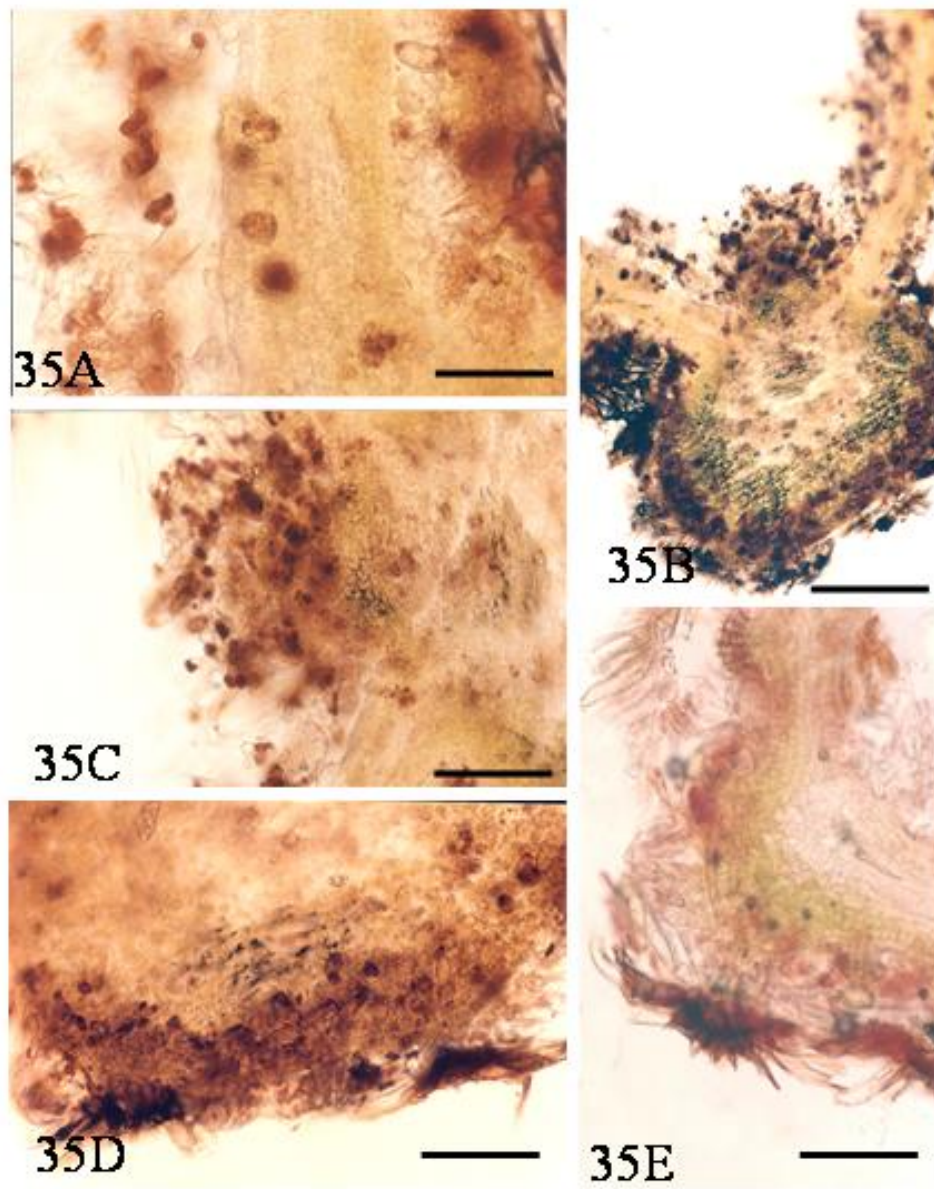


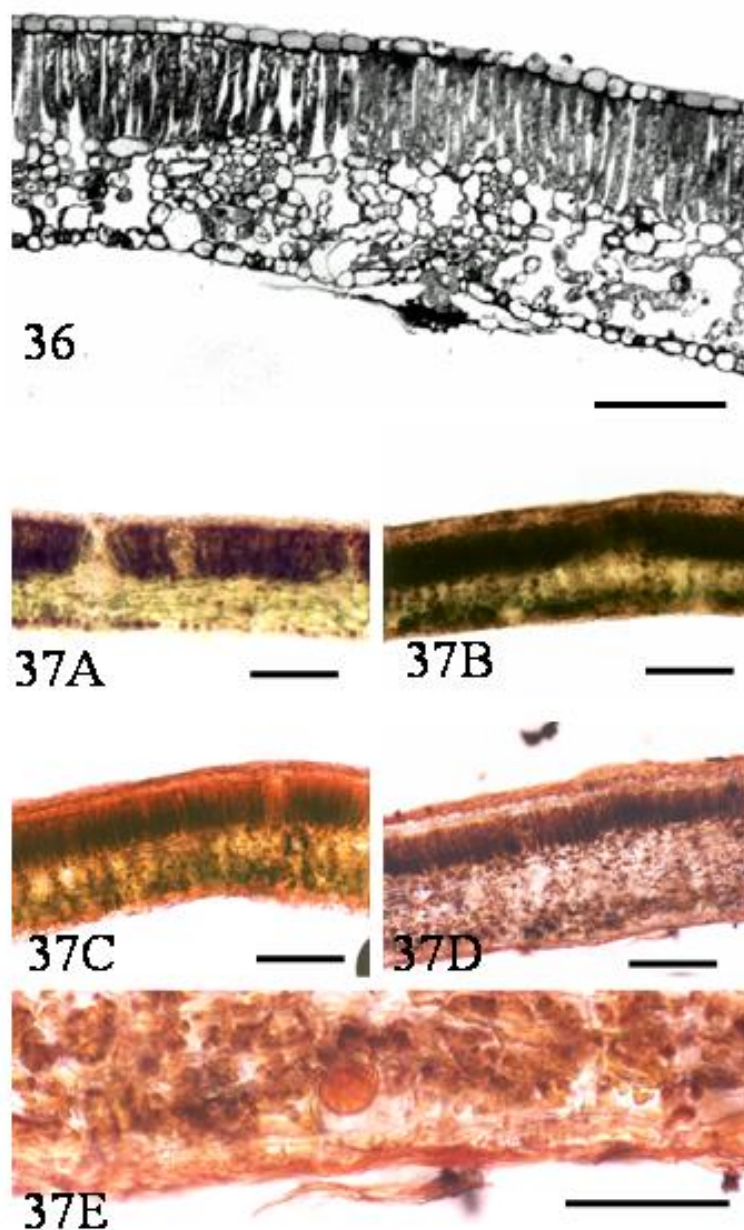
Figura 28- Microscopia eletrônica de transmissão em corte transversal da folha de *Croton macrobotrys*. Fig. 28- Detalhe das células da base do tricoma, mostrando núcleo proeminente (*), grande vacúolo (★) e numerosos cloroplastos (seta) barra = 2,2µm.



Figuras 29- 34 – Microscopia óptica de campo claro mostrando corte transversal da folha em diferentes estádios do desenvolvimento de *Croton macrobothrys*. Fig. 29 e 30- Folha jovem. Fig. 31- Folha no estágio intermediário do desenvolvimento. Fig. 32- Detalhe de glândula crateriforme. Fig. 33- Folha adulta evidenciando idioblasto no parênquima paliádico contendo drusas de oxalato de cálcio (seta). Fig. 34- Folha adulta, evidenciando estrutura dorsiventral. Figuras 29-34 barra= 10 μ m.



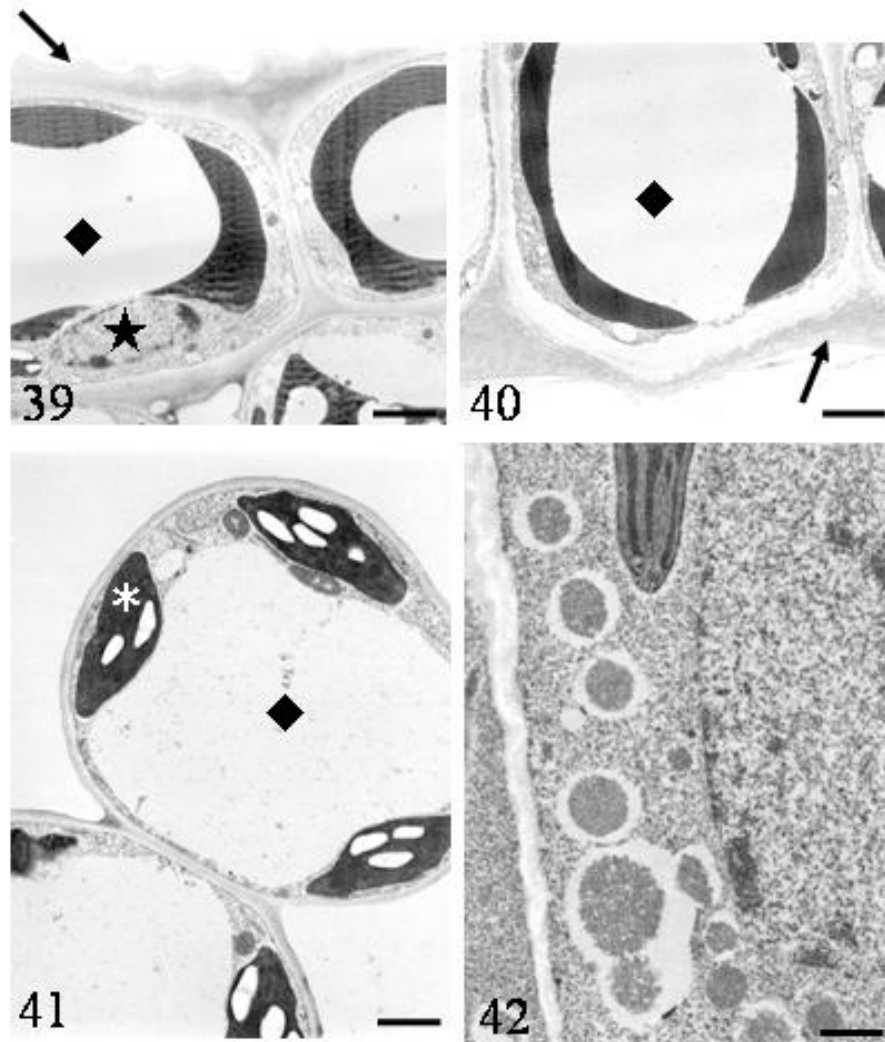
Figuras 35 A-E Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em secção transversal de folha no estágio inicial do desenvolvimento de *Crotom macrobotrys* evidenciando a presença de substâncias fenólicas nos tricomas e no parênquima paliádico Fig. 35A- Reação de dicromato de potássio. Fig. B- Cloreto férrico. Fig. C- Dicromato de Potássio. Fig. D- Cloreto Férrico. Fig. E- Reagente de Reeve. Figuras 35A, 35C, e 35D barra=50µm, Figuras 35B e 35E barra=100µm.



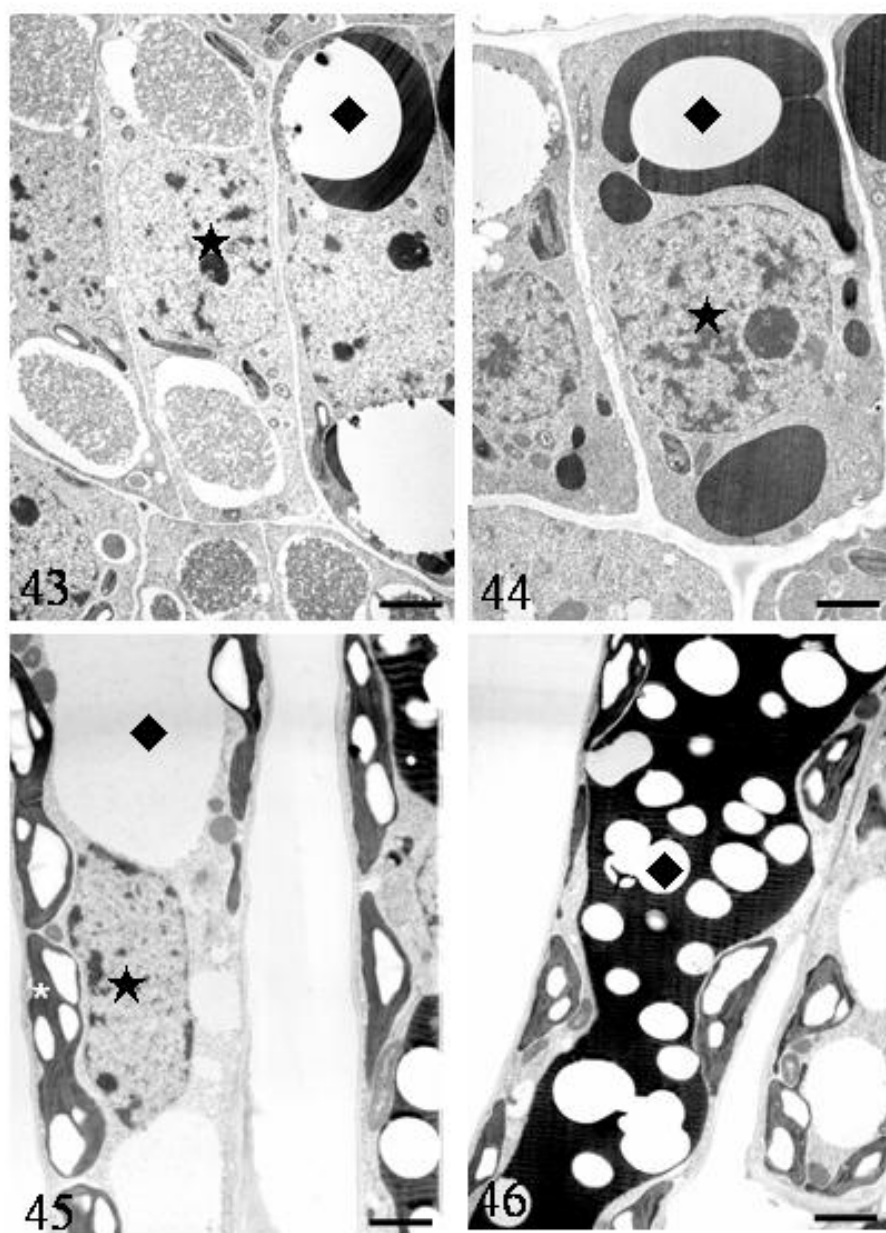
Figuras 36-37 – Microscopia óptica de campo claro em secções transversais de folhas totalmente expandidas de *Croton macrobothrys*. Fig. 36 - Folha adulta, 37 A-E Testes histoquímicos. Fig. A-C Reação de cloreto férrico, dicromato de potássio e Reeve, respectivamente evidenciando a presença de substâncias fenólicas no parênquima paliádico. Fig. D- Reagente Sudan IV evidenciando a deposição de substâncias lipídicas sobre a cutícula, Fig. E- Reação pelo Sudan IV evidenciando a presença de conteúdo lipídico na glândula crateriforme. Figuras 36 e 37A-D barra = 100 μ m. Figura 37E barra = 50 μ m.



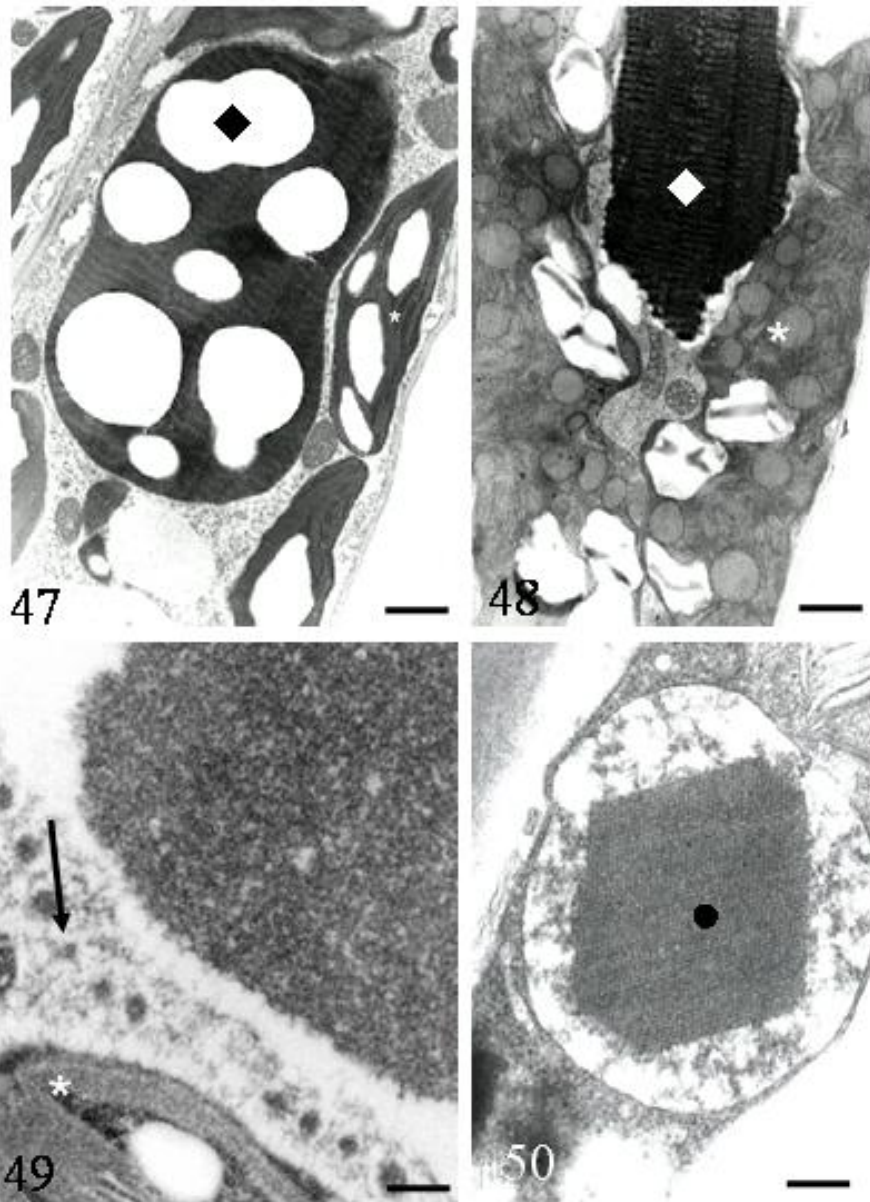
Figuras 38A-C. Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em nervura principal de folhas totalmente expandidas em *Croton macrobothrys*. Fig. 38 A-C– Secção transversal evidenciando a presença de substâncias fenólicas pelos testes histoquímicos de cloreto férrico, dicromato de potássio e reagente de Reeve, respectivamente, dispersas randomicamente na epiderme, na região correspondente ao parênquima cortical e no feixe vascular barra = 200 μm .



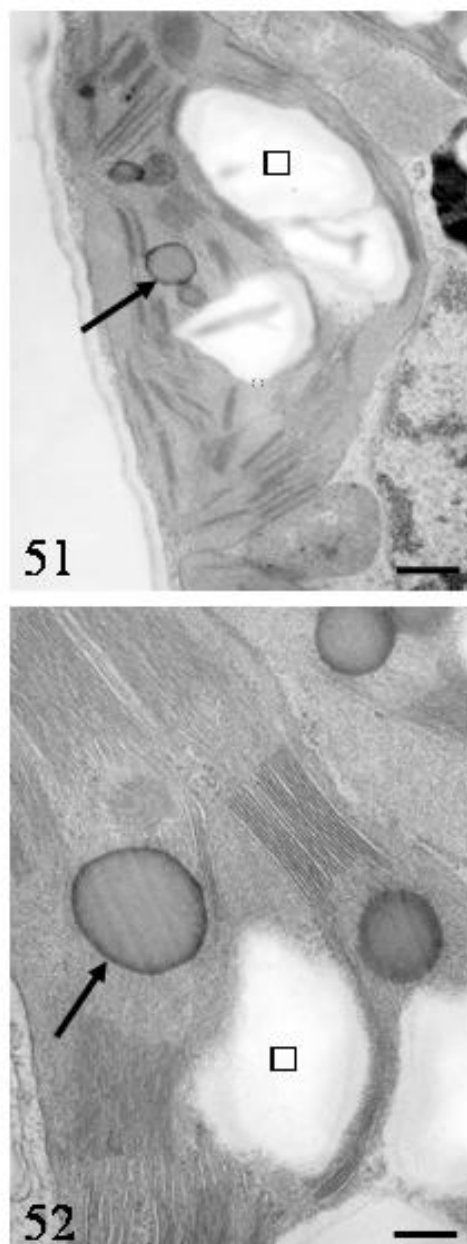
Figuras 39-42- Microscopia eletrônica de transmissão em secção transversal da lâmina foliar de *Croton macrobothrys* em estágio intermediário do desenvolvimento. Fig. 39 e 40- Secção mostrando superfície adaxial e abaxial, evidenciando vacúolo com substâncias eletrondensas (◆), núcleo proeminente (★) e cutícula delgada (seta). Fig. 41- Detalhe das células do parênquima lacunoso, evidenciando a presença de vacúolo bem desenvolvido (◆) e cloroplastos contendo grãos de amido (*). Fig. 42- vesículas no parênquima paliádico. Figuras 39 e 41 barra=2,4µm, 40 barra=2,0µm, 42 barra=4,0µm.



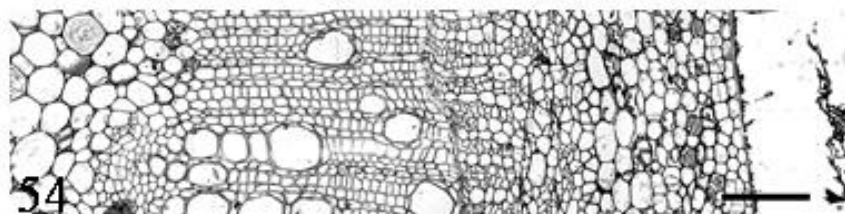
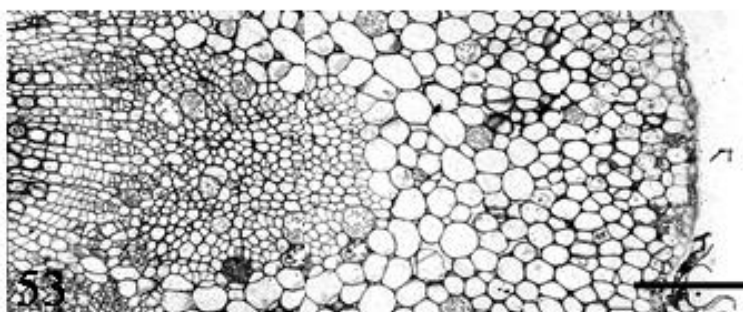
Figuras 43-46- Microscopia eletrônica de transmissão em corte transversal da folha em diferentes estádios do desenvolvimento de *Coton macrobothrys*. Fig. 43 e 44- Detalhe do parênquima paliádico de folhas no estágio inicial do desenvolvimento, evidenciando núcleo proeminente (★) e vacúolo com dimensões reduzidas (◆) respectivamente. Fig. 45 e 46- Detalhe do parênquima paliádico de folhas adultas evidenciando cloroplastos com numerosos grãos de amido (*), núcleo proeminente (★) e vacúolo bem desenvolvido (◆). Figura 43 barra= 2,4μm , 44 barra= 1,6μm, 45 barra= 1,8μm e 46 barra= 2,5μm.



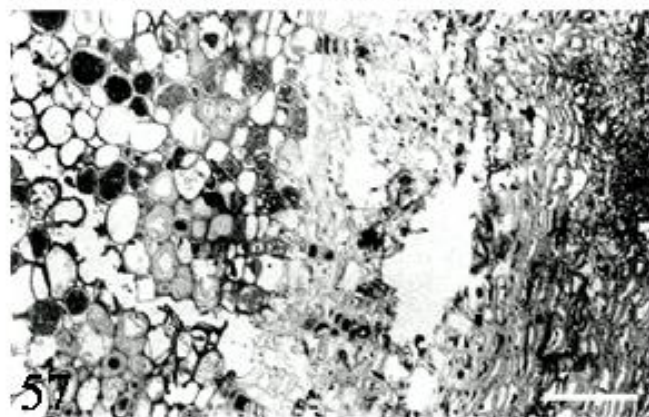
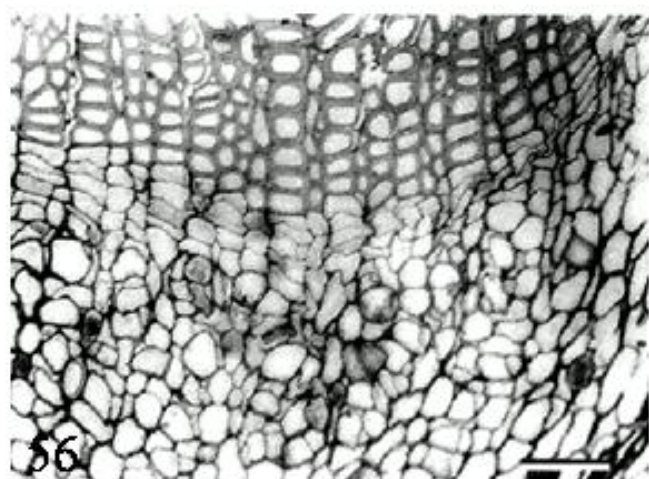
Figuras 47-50- Microscopia eletrônica de transmissão em seções transversais de folha totalmente expandida de *Croton macrobothrys*. Fig. 47- Detalhe de células do parênquima paliádico, evidenciando vacúolo bem desenvolvido com substâncias eletrondensas (◆), cloroplastos com numerosos grãos de amido (*). Fig. 48- vacúolo de células do parênquima paliádico contendo substâncias eletrondensas (◆), cloroplastos contendo numeroso grãos de amido e plastoglôbulos. Fig. 49- detalhe de vesículas em células do parênquima paliádico (seta). Fig. 50- Peroxissomo com estrutura paracristalina (●). Figura 47 barra= 0,6µm, 48 barra=1,3µm, 49 barra=4,5µm, 50 barra 0,2µm.



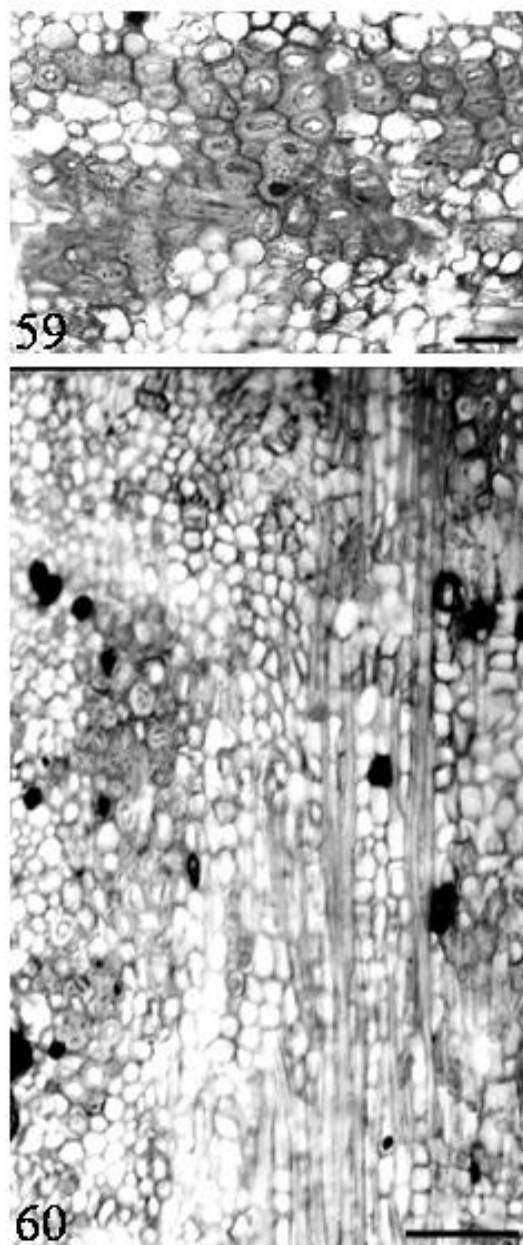
Figuras 51-52- Microscopia eletrônica de transmissão em secção transversal de folhas totalmente expandidas em *Croton macrobotrys*. Fig. 51 e 52- Detalhe do Cloroplasto do parênquima paliádico, evidenciando grãos de amido (σ) e plastoglôbulos (seta). Figura 51 barra = 0,5 μ m, 52 barra = 0,25 μ m.



Figuras 53-55- Microscopia óptica de campo claro mostrando secções transversais do caule de *Croton macrobothrys*. Fig. 53- Caule primário. Fig. 54- Caule em etapa inicial de crescimento secundário. Fig. 55- Caule na fase intermediária do caule secundário. Figuras 53-55 barra = 50 μm .



Figuras 56-58- Microscopia óptica de campo claro em corte transversal do caule em crescimento secundário de *Croton macrobothrys*. Fig. 56- Caule secundário. Fig. 57- Detalhe da Feloderme, 58- Lenticela. Figuras 56-58 barra = 10 μm .

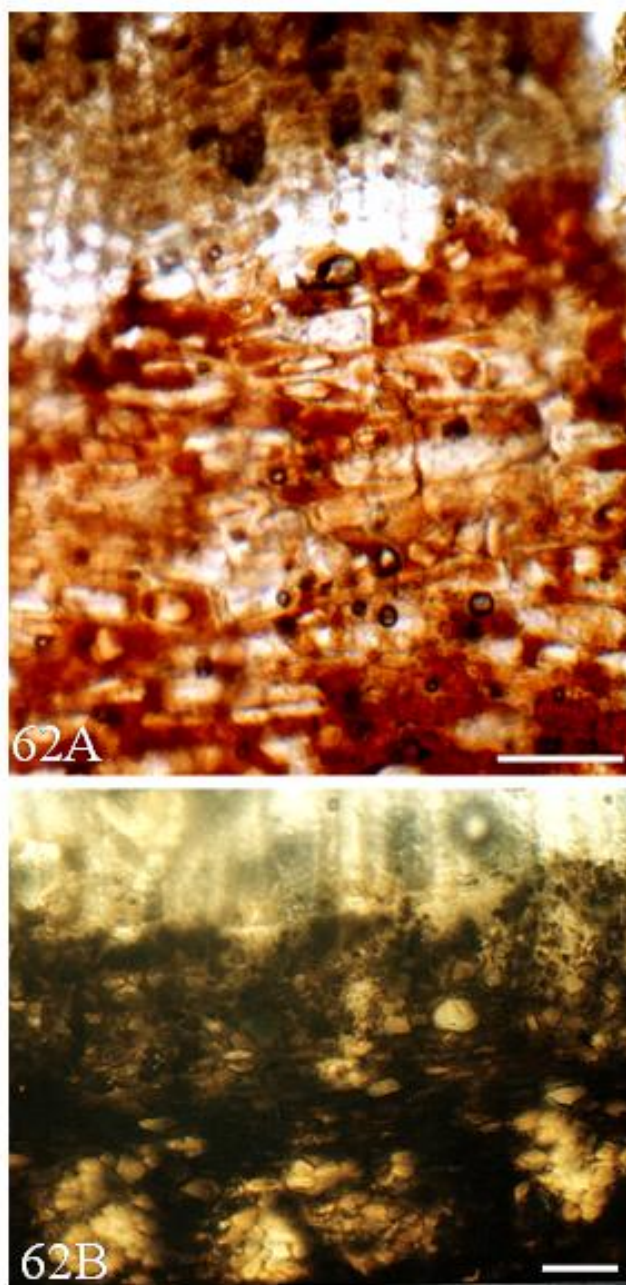


Figuras 59-60- Microscopia óptica de campo claro em secções do caule secundário de *Croton macrobothrys*. Fig. 59- Corte transversal evidenciando as fibras extraxilemáticas. Fig. 60- Laticíferos em corte longitudinal do caule secundário. Figuras 59-60 barra= 10 μ m.

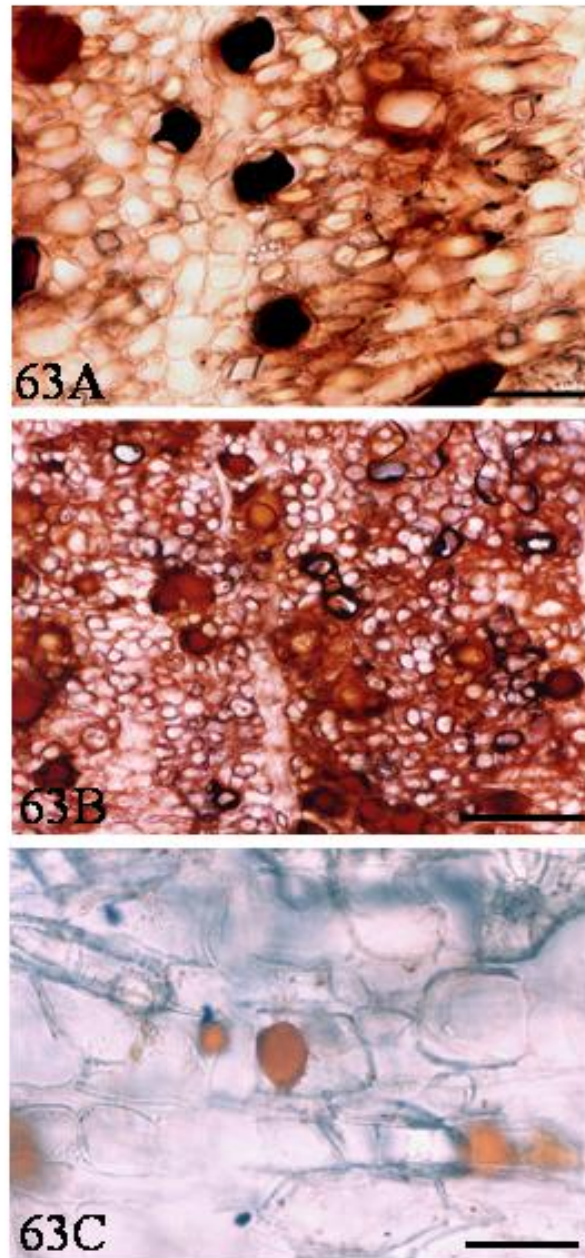


61

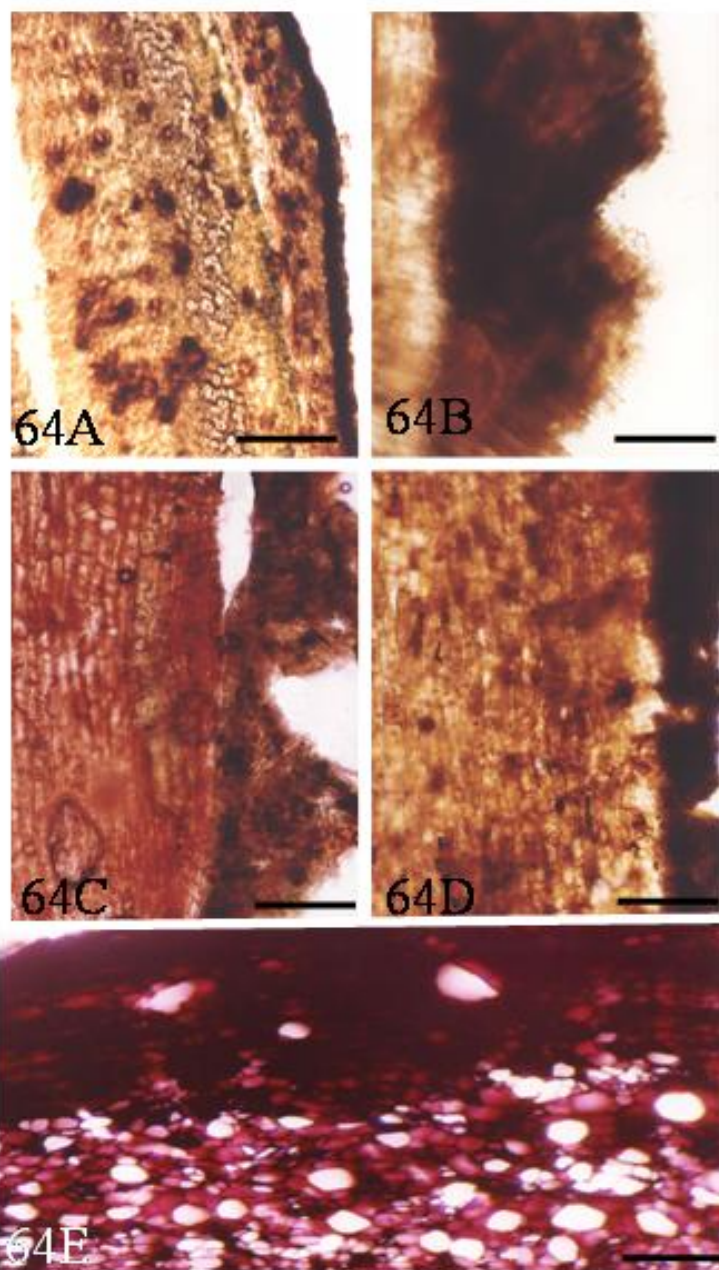
Figura 61- Microscopia óptica de campo claro em secção longitudinal do caule secundário mostrando teste histoquímico de *Croton macrobothrys*. Fig. 61 - Laticíferos evidenciando conteúdo lipídico (seta) através da reação com Sudan IV barra = 10 μ m.



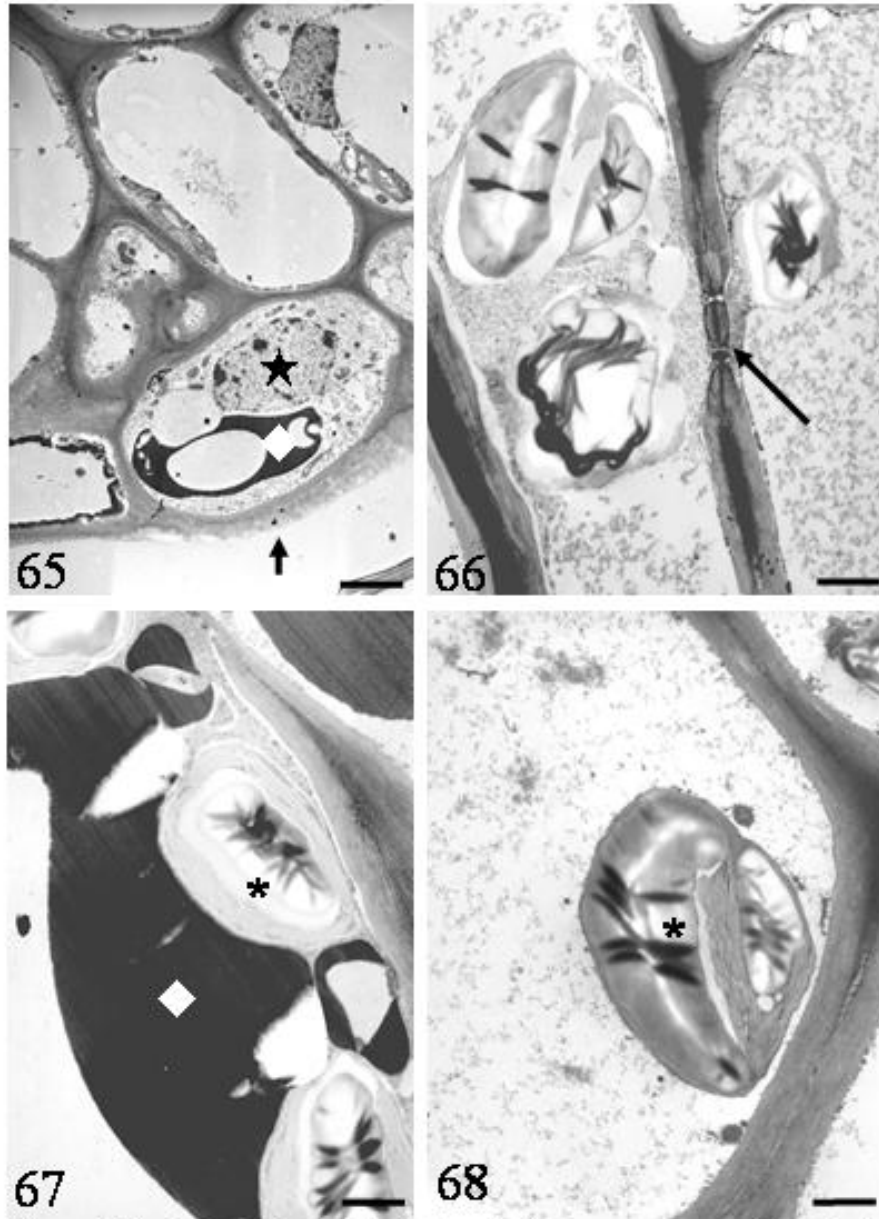
Figuras 62 A-B- Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em corte transversal do caule secundário de *Croton macrobotrys* evidenciado a presença de substâncias fenólicas. Fig. 62 A- Dicromato de potássio, evidenciando o conteúdo fenólico nas células do parênquima cortical Fig. B- Cloreto fêrico, idem. Figuras 62 A e 62B barra = 10 μ m.



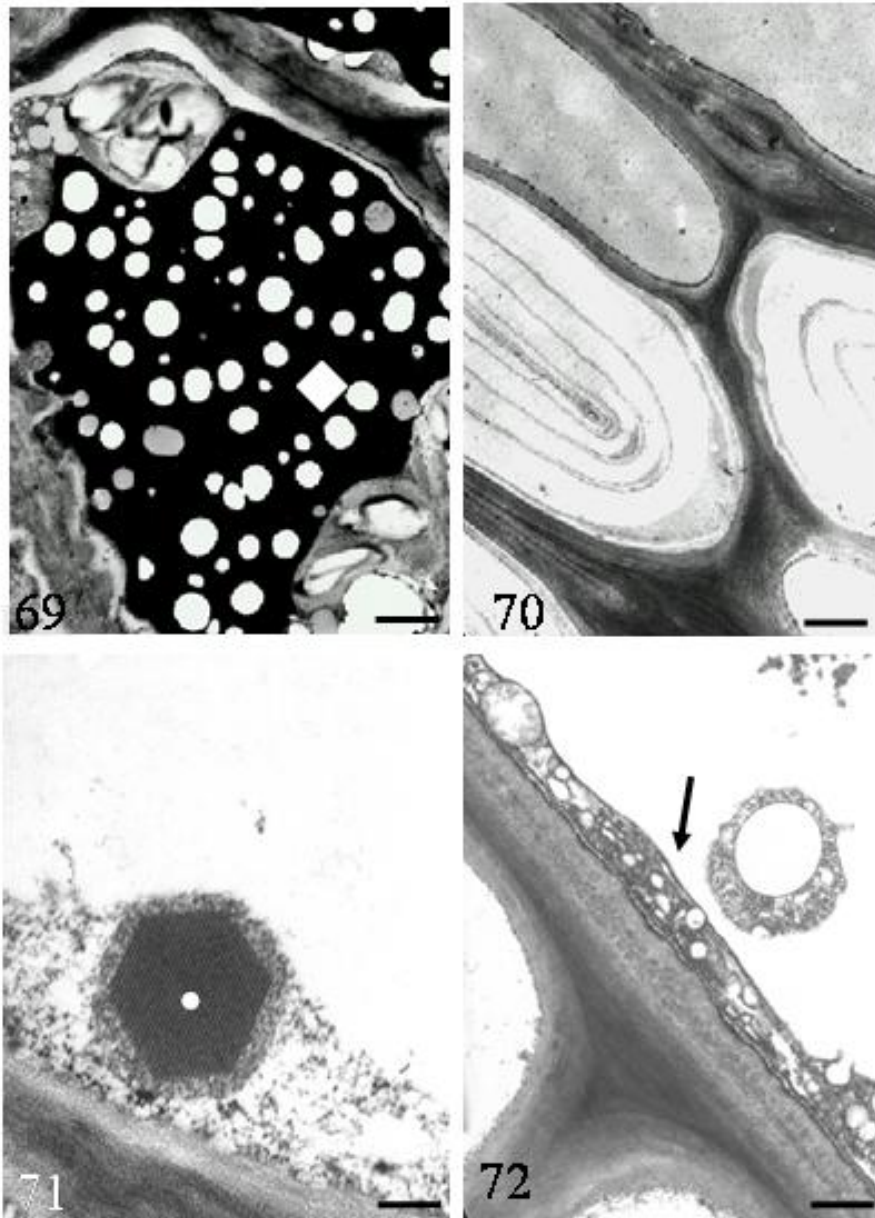
Figuras 63 A-C. Microscopia óptica de campo claro evidenciando testes histoquímicos em cortes transversais do caule de *Crotom macrobothrys*. Fig. 63A- Dicromato de Potássio evidenciando a presença de idioblastos contendo conteúdo fenólico. Fig. 63B- Reagente de Reeve evidenciando a presença de compostos fenólicos no parênquima cortical. Figura 63C- Sudan IV evidenciando a presença de gotículas lipídicas distribuídas nas células do parênquima cortical. Figuras 63A e 63C barra=50µm, 62B barra=100µm.



Figuras 64A-E- Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em secções transversais do caule de *Croton macrobotrys*. Fig.64A- Dicromato de Potássio evidenciado compostos fenólicos no parênquima cortical e periderme. Fig. 64B e 64C- Cloreto férrico e Reagente de Reeve evidenciando compostos fenólicos. Fig. 64D- Reagente de Lugol evidenciando a presença de glicídios no parênquima cortical e periderme. Fig. 64E- Reagente de Vanilina Sulfúrica evidenciando a presença de terpenos no caule. Figuras 64A e 64D barra= 200µm, 64B, 64C e 64E barra= 100µm.



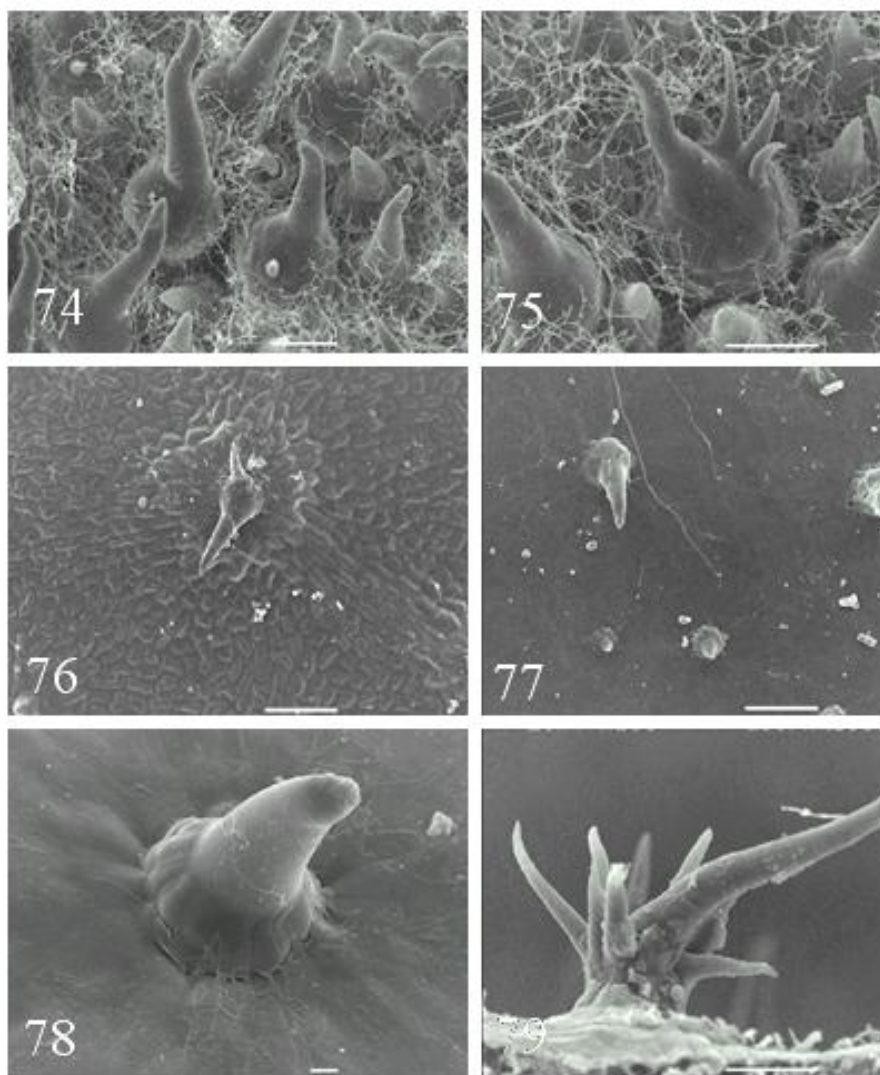
Figuras 65-68- Microscopia eletrônica de transmissão em corte transversal do caule de *Croton macrobotrys*. Fig. 65 - Caule primário mostrando células epidérmicas com conteúdo eletrondenso no vacúolo (◆), núcleo proeminente (★) e cutícula espessa (seta). Fig. 66- Parênquima cortical, mostrando plasmodesmas (seta). Fig. 67- Célula do parênquima cortical evidenciando vacúolo com substâncias eletrondensas (◆) e cloroplastos com grãos de amido no estroma (*). Fig. 68- Detalhe do cloroplasto apresentando grãos de amido (*). Figura 65 barra = 2,7µm, 66 barra = 2,4 µm, 67 barra = 1,4 µm, 68 barra = 1,1µm.



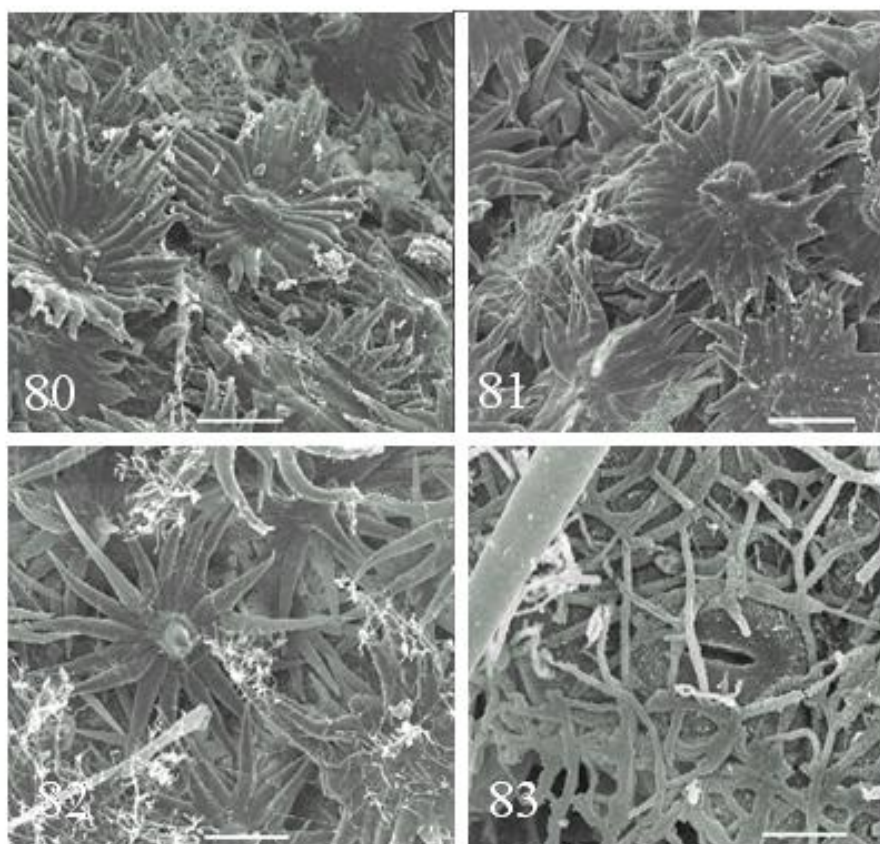
Figuras 69-72- Microscopia eletrônica de transmissão em corte transversal do caule secundário de *Croton macrobothrys*. Fig. 69- Vacúolo com substâncias eletrondensas (◆). Fig. 70- Lamelas das fibras extraxilemáticas do caule secundário. Fig. 71- peroxissomo evidenciando estrutura paracristalina (●). Fig. 72- Detalhe de vesículas e retículo endoplasmático (seta). Figuras 69 barra = 2,1µm, 70 barra = 2,5µm, 71 barra = 2,8µm, 72 barra = 0,6µm.



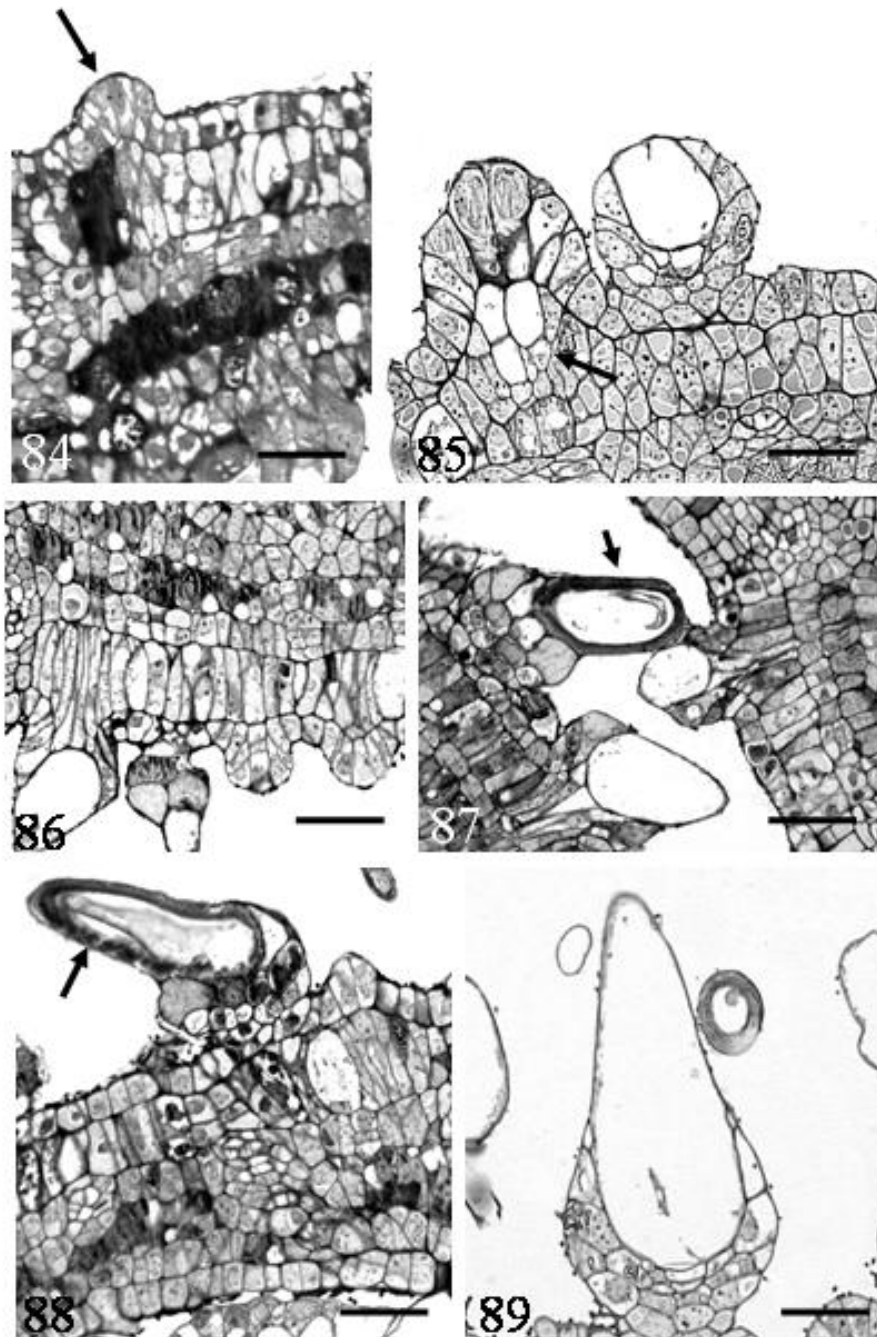
Figura 73. Fotografia de *Croton floribundus*. A – *Habitus*. B – Detalhe da inflorescência.



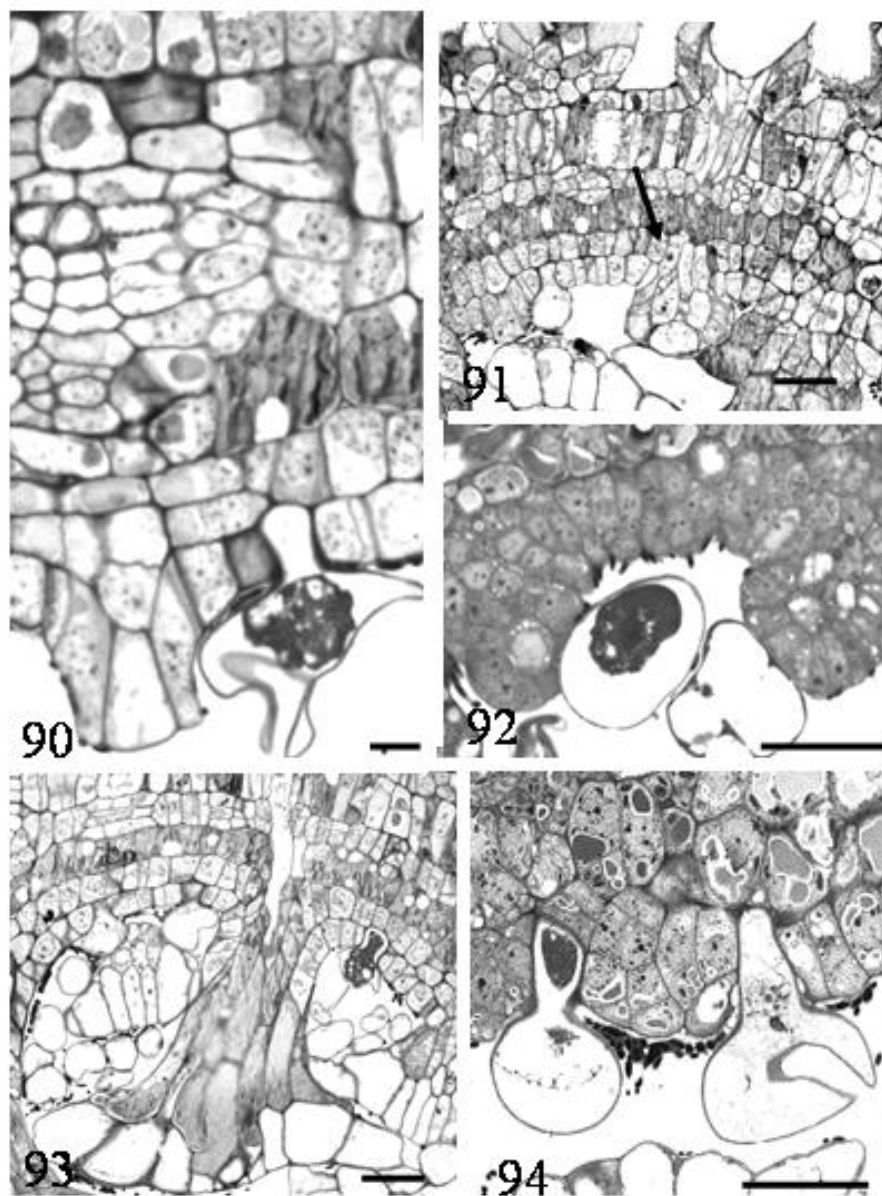
Figuras 74-79. Microscopia eletrônica de varredura dos tricomas tectores da epiderme adaxial de *Croton floribundus*. 74 e 75- Folhas jovens. 76 e 77- Folha adulta. 78- Tricoma acicular da folha totalmente desenvolvida. 79- Detalhe de tricoma multisseriado da folha adulta. Figuras 74, 75, 79 barra = 50 μm , 76 e 77 barra = 100 μm , 78 barra = 10 μm .



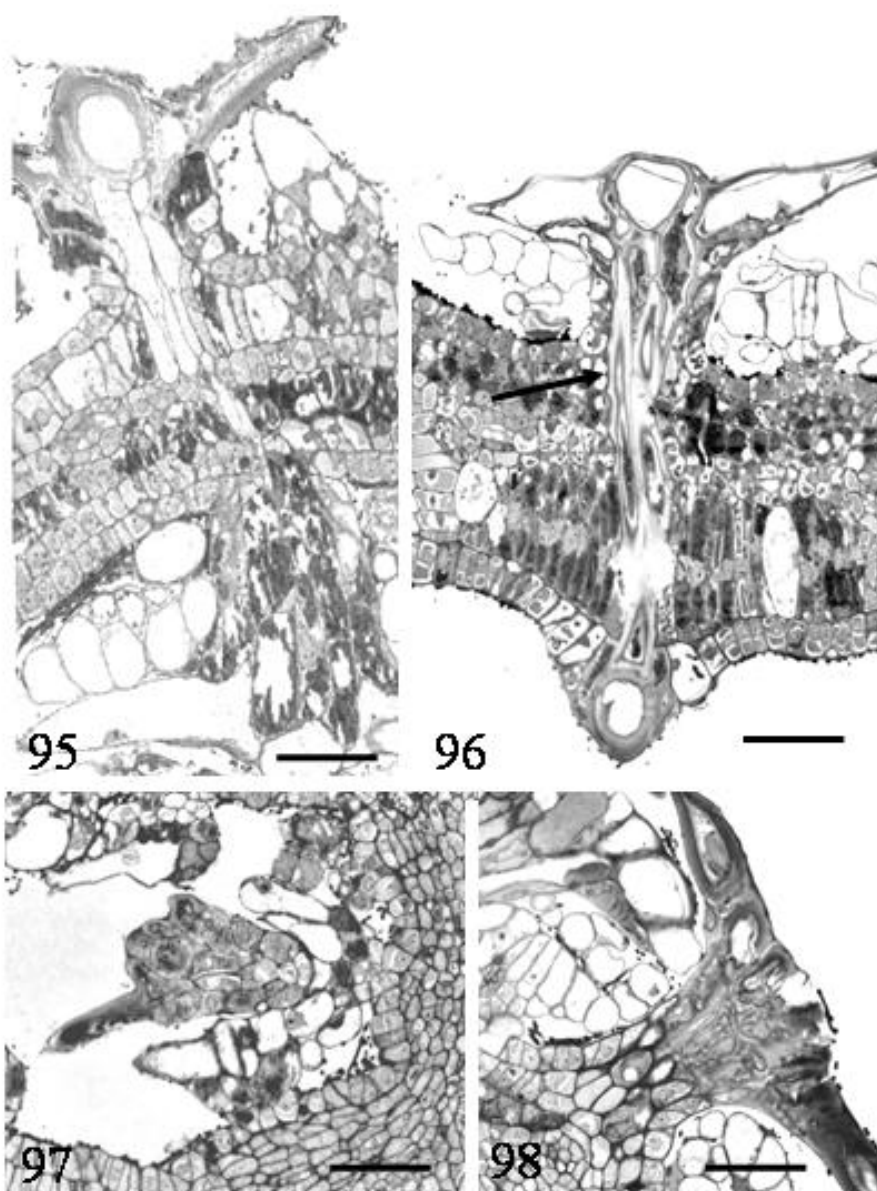
Figuras 80-83 – Microscopia eletrônica de varredura da epiderme abaxial de *Croton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento. 80 e 81- Tricomas do tipo lepdote da folha jovem. 82- Tricoma do tipo lepdote de folha totalmente expandida. 83- Detalhe de um estômato da folha adulta. Figuras: 80, 81 e 82 barra = 100 μm , 83 barra = 10 μm .



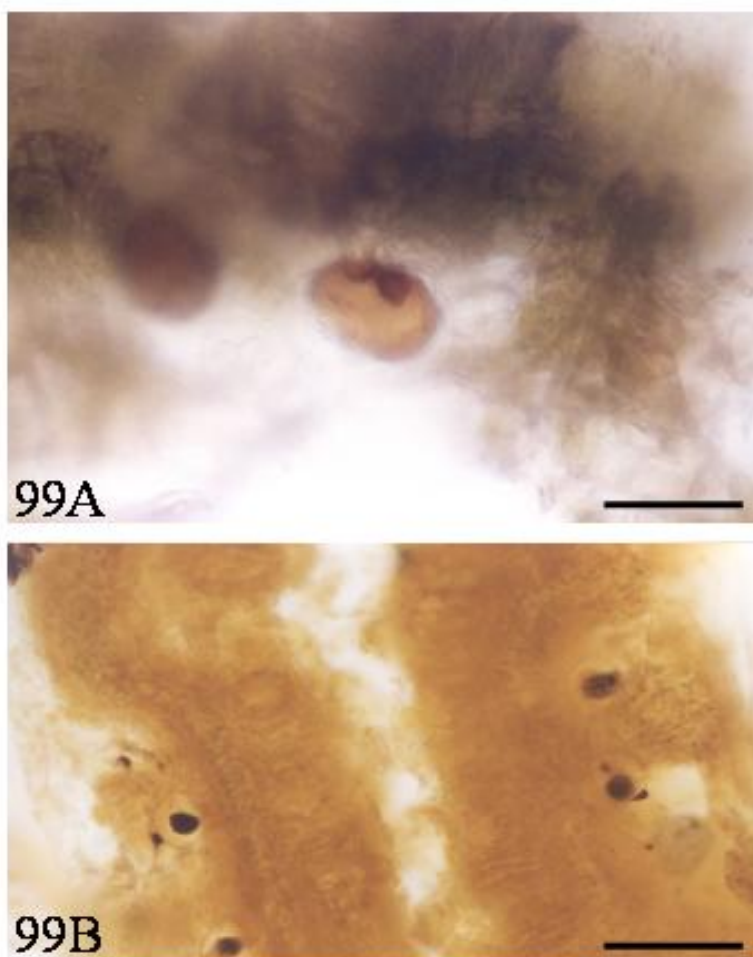
Figuras 84-89- Microscopia óptica de campo claro mostrando ontogênese dos tricomas da epiderme adaxial de *Croton floribundus*. 84- Corte transversal da folha jovem mostrando protrusão epidérmica (seta). 85 e 86- Início do desenvolvimento do tricoma e crescimento intrusivo das células subepidérmicas (seta). 87 e 88- Célula apical com espessamento secundário da parede (seta). 89- Detalhe da célula apical do tricoma acicular. Figuras: 84-89 barra = 10 μ m.



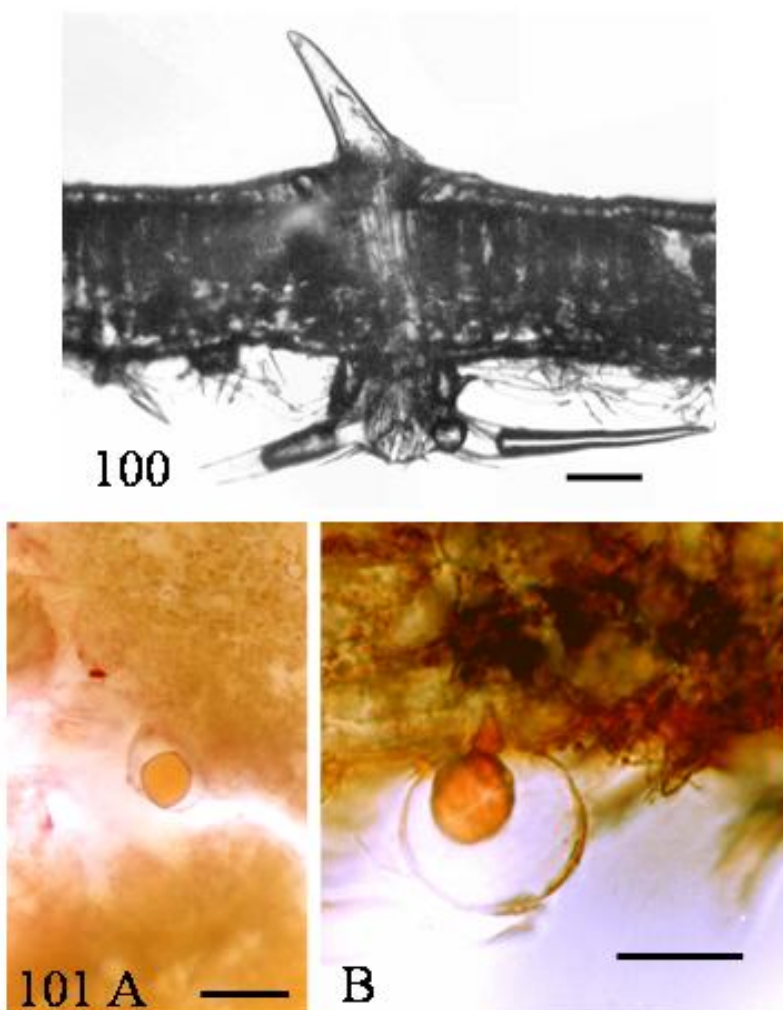
Figuras 90-94- Microscopia óptica de campo claro mostrando a ontogênese dos tricomas da epiderme abaxial de *Croton floribundus*. 90- Corte transversal mostrando início do desenvolvimento do tricoma tector e tricoma glandular. 91- invaginação de células parenquimáticas para o interior do tricoma (seta). 92- detalhe do tricoma glandular. 93- Tricoma tector em folha totalmente expandida. 94- Detalhe do tricoma glandular antes e depois da secreção. Figuras 90-94 barra=10µm.



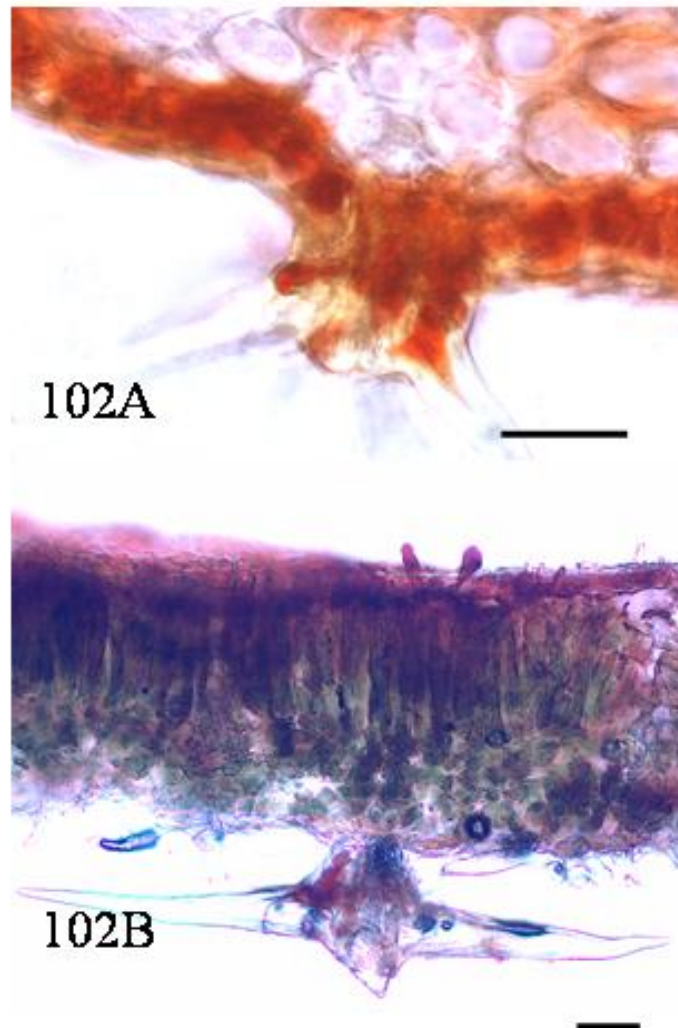
Figuras 95-98- Microscopia óptica de campo claro de corte transversal da folha de *Croton floribundus*. 95- Início da diferenciação do parênquima paliádico, próximo ao tricoma. 96- Detalhe de esclereídes (seta) conectando os tricomas de ambas as faces da epiderme. 97 e 98- Tricoma dendrítico da região da nervura. Figuras 95-98 barra = 10 μm .



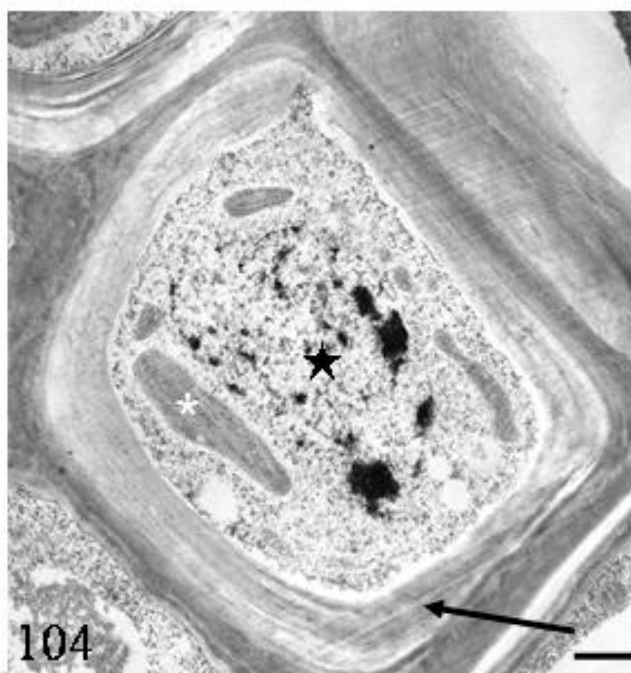
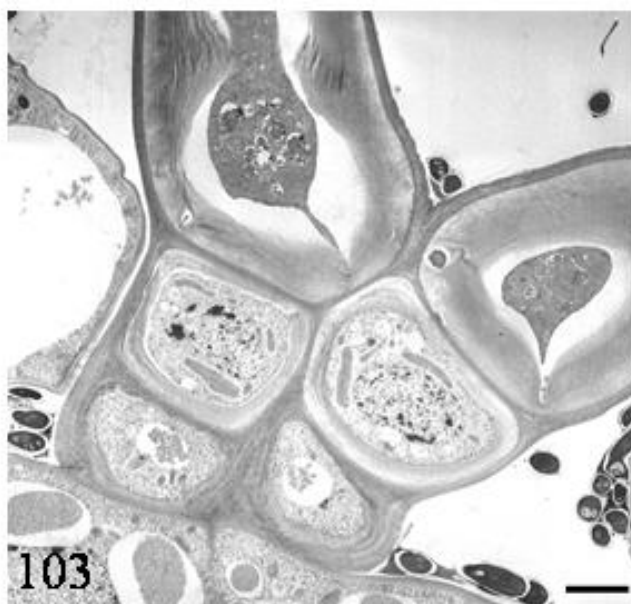
Figuras 99A-B- Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em folhas de *Croton floribundus* no estágio inicial do desenvolvimento. 99A- Detalhe de substâncias fenólicas no interior do tricoma glandular evidenciada pela reação de cloreto férrico. 99B- Detalhe do tricoma glandular com conteúdo glicídico, evidenciado pelo reagente de Lugol. Figura 99A barra= 50 μm e 99B barra= 100 μm .



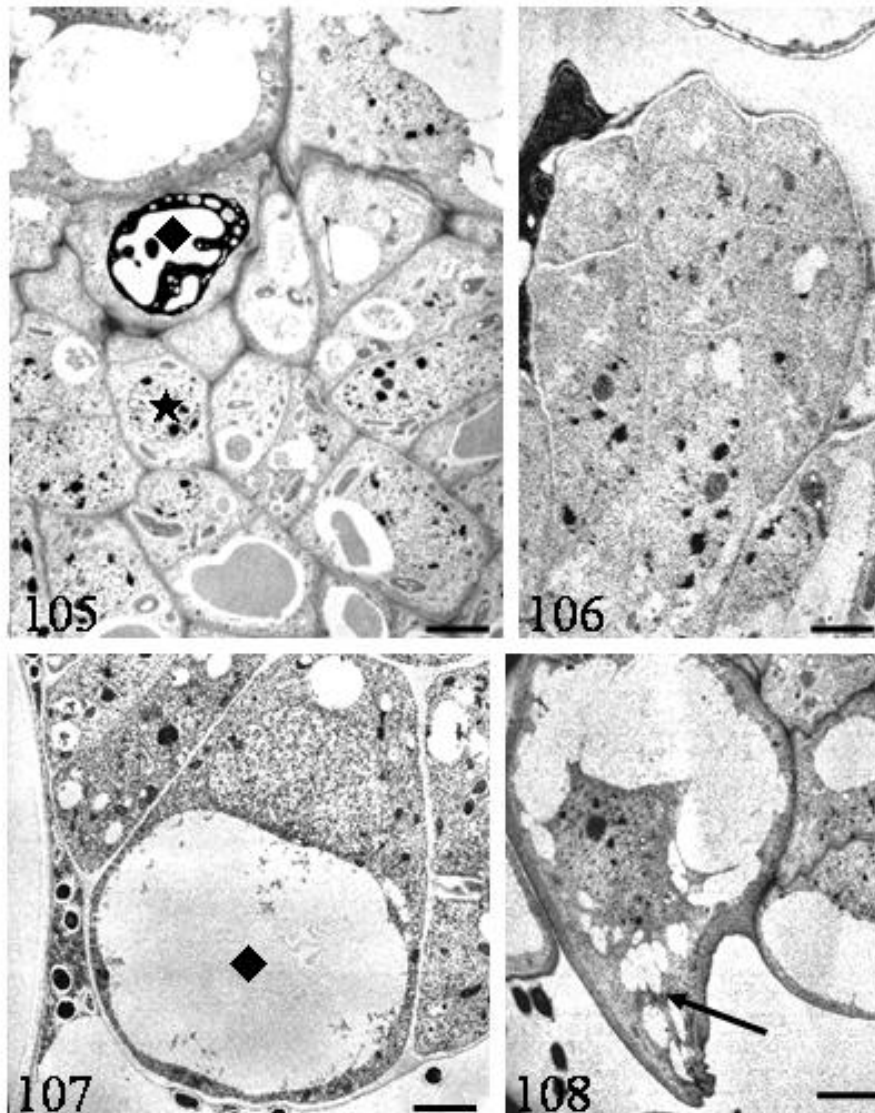
Figuras 100-101- Microscopia óptica de campo claro em corte transversal da folha em diferentes estádios do desenvolvimento de *Croton floribundus*. 100- Corte transversal da folha adulta recém coletada evidenciando tricomas da face adaxial e abaxial conectados por células esclerenquimáticas. 101- Testes histoquímicos com reagente de Sudan IV, em cortes transversais da folha em diferentes estádios do desenvolvimento. 101A- Folha jovem, evidenciando tricoma glandular contendo inclusões lipídicas. 101B- Folha totalmente expandida, evidenciando tricoma glandular contendo inclusões lipídicas. Figura 100 barra = 10 μm , 101A e 101B barra = 50 μm .



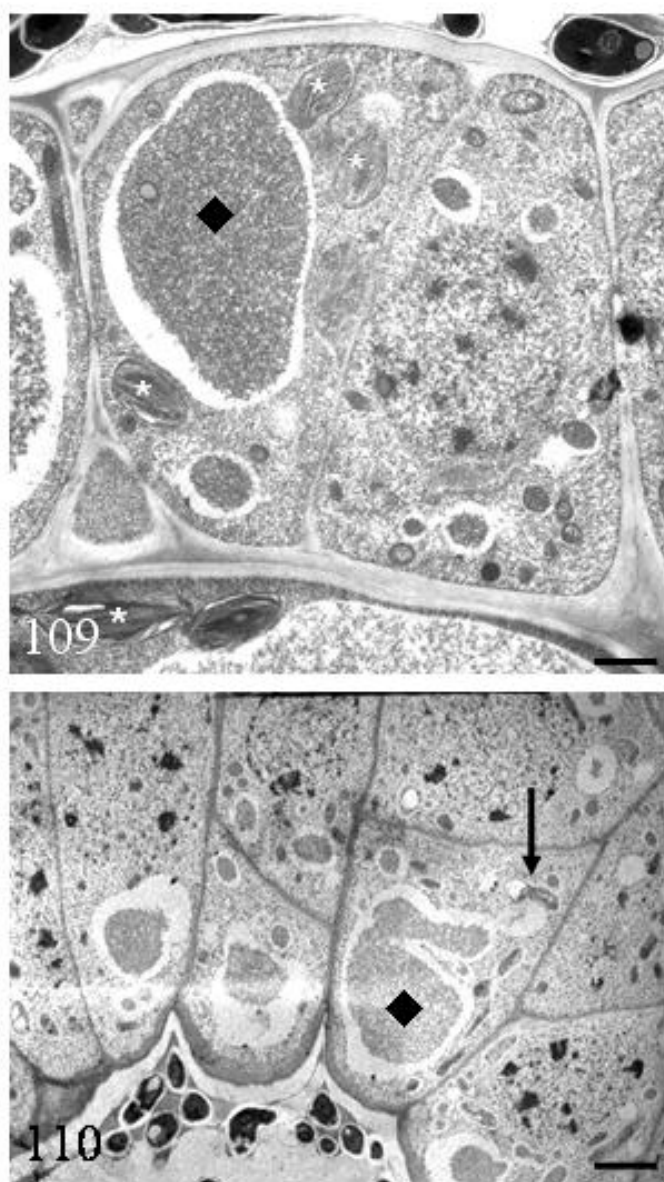
Figuras 102A-B- Microscopia óptica de campo claro evidenciando testes histoquímicos em corte transversal de folhas totalmente expandidas de *Croton floribundus*. 102A- reação de Reeve evidenciando a presença de compostos fenólicos nas células epidérmicas, nas células radiais e do pedúnculo do tricoma. 102B- reação de cloreto férrico evidenciando a presença de compostos fenólicos no tricoma e no mesófilo. Figuras 102A e 102B barra = 50 μ m.



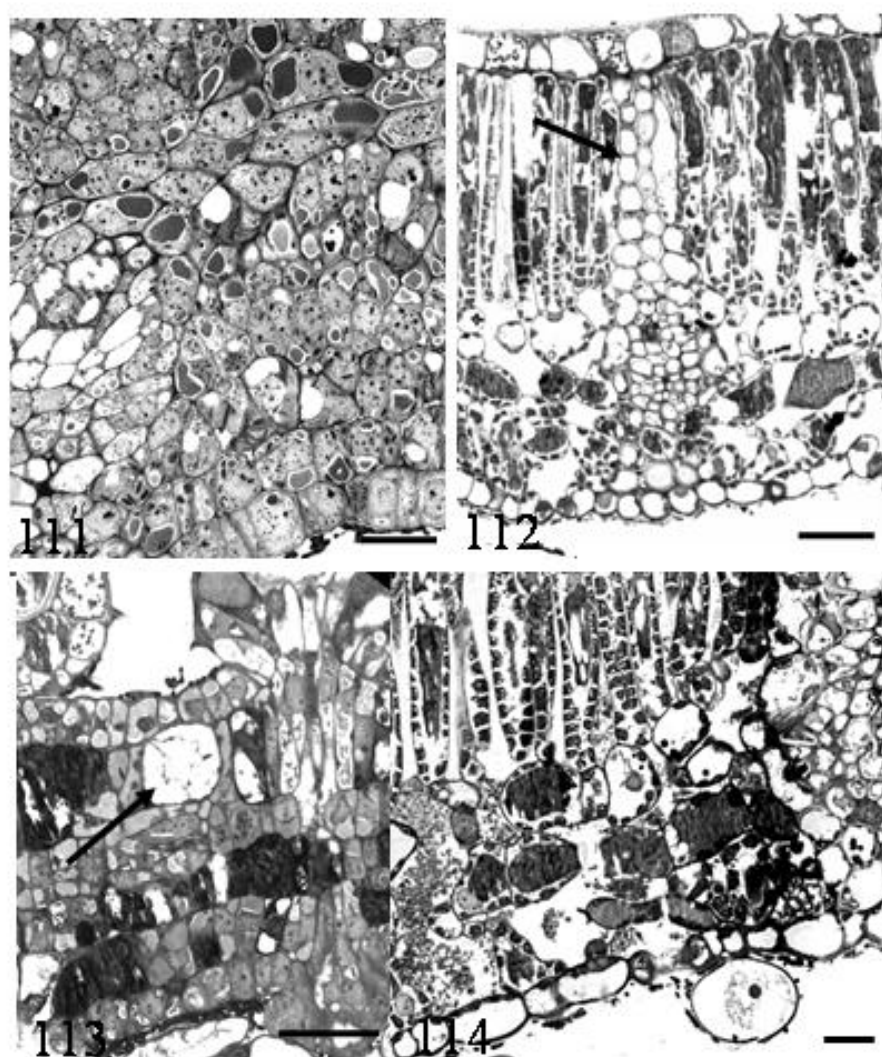
Figuras 103-104- Microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal da folha de *Croton floribundus*. 103- Tricoma tector mostrando padrão multisseriado. 104- Detalhe de célula do tricoma evidenciando início do espessamento secundário da parede (seta), citoplasma denso, núcleo proeminente (★) e cloroplastos (*). Figura 103 barra= 3,2µm, 104 barra= 0,8µm.



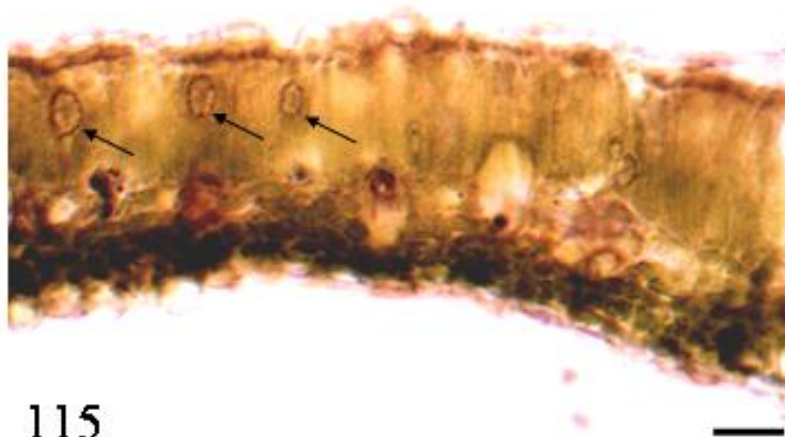
Figuras 105-108- Microscopia eletrônica de transmissão de tricomas de *Croton floribundus*. 105- Detalhe do interior do pedúnculo do tricoma, mostrando células com citoplasma denso, núcleo proeminente (★) e vacúolo preenchido por substâncias eletrondensas (◆). 106- Corte transversal mostrando início do desenvolvimento das células do tricoma. 107- Tricoma glandular da folha jovem, evidenciando grande vacúolo. 108- Tricoma glandular da folha adulta evidenciando vesículas migrando para a região apical (seta). Figura 105 barra = 2,8µm, 106 barra= 2,7µm, 107 barra= 3,0µm, 108 barra= 1,2µm.



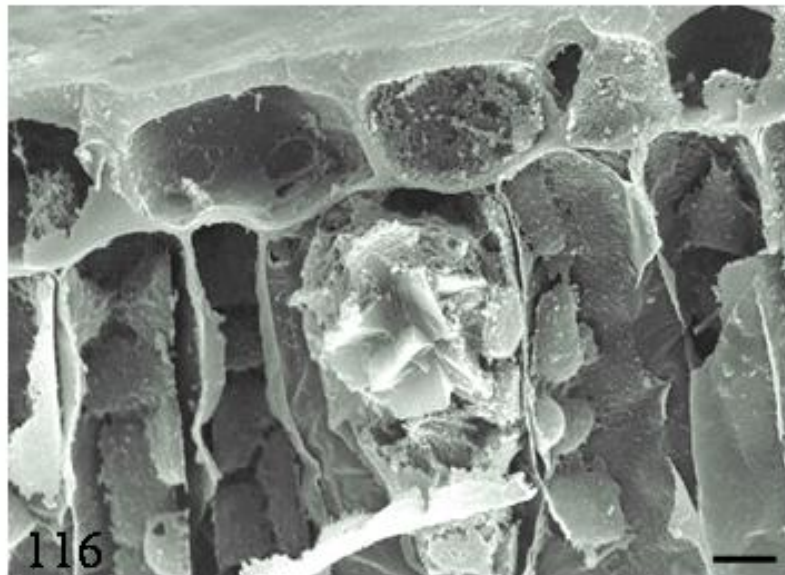
Figuras 109-110- Microscopia eletrônica de transmissão em secção transversal da folha jovem de *Croton floribundus*. 109- Células epidérmicas da face adaxial, mostrando citoplasma denso, vacúolo preenchido por substâncias eletrondensas (◆) e numerosos cloroplastos (*). 110- Células epidérmicas da face abaxial, vacúolo (◆), cloroplastos (seta). Figura 109 barra = 1,40µm, 110 barra=2,0µm.



Figuras 111-114- Microscopia óptica de campo claro em secção transversal da folha de *Croton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento. 111- Mesófilo não diferenciado. 112- Detalhe do feixe vascular, evidenciando a bainha do feixe (seta). 113- Células parenquimáticas contendo substâncias eletrondensas e idioblasto com drusas de oxalato de cálcio (seta). 114- Detalhe da lâmina foliar evidenciando tricoma glandular em folha totalmente expandida. Figuras 112-114 barra= 10µm.

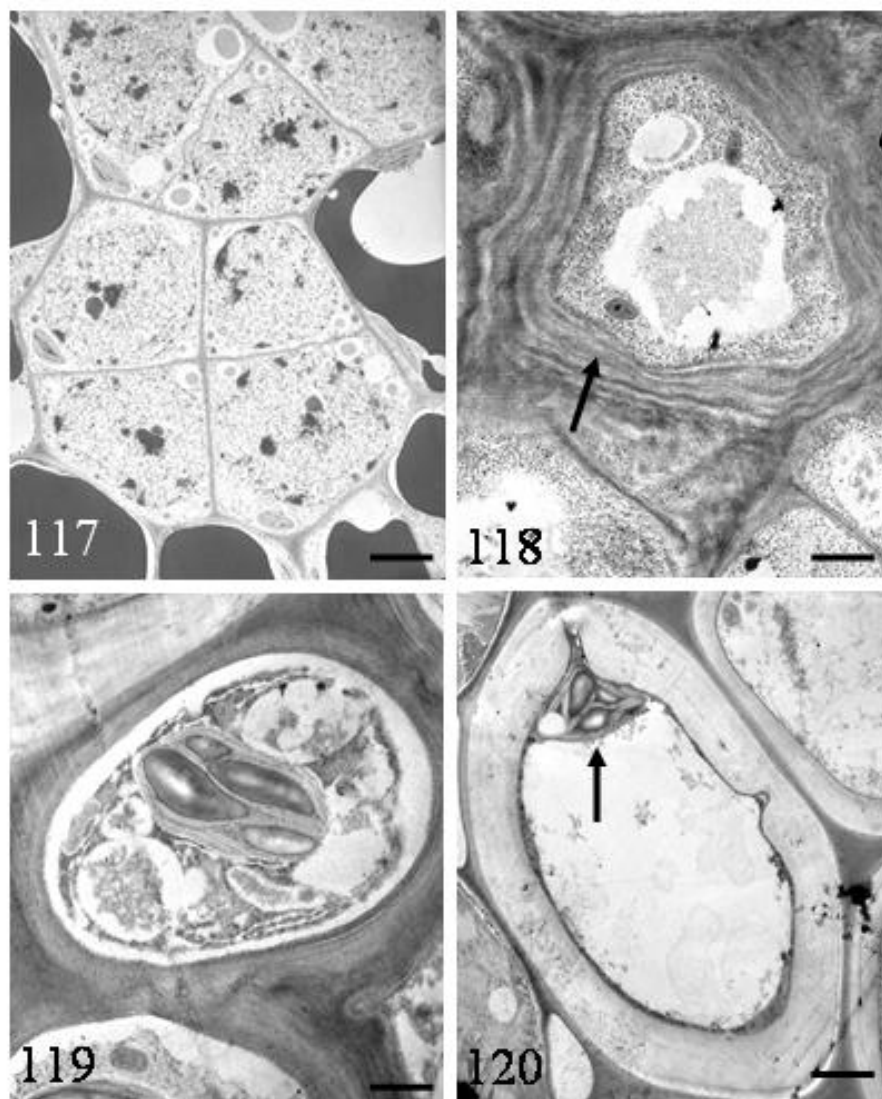


115

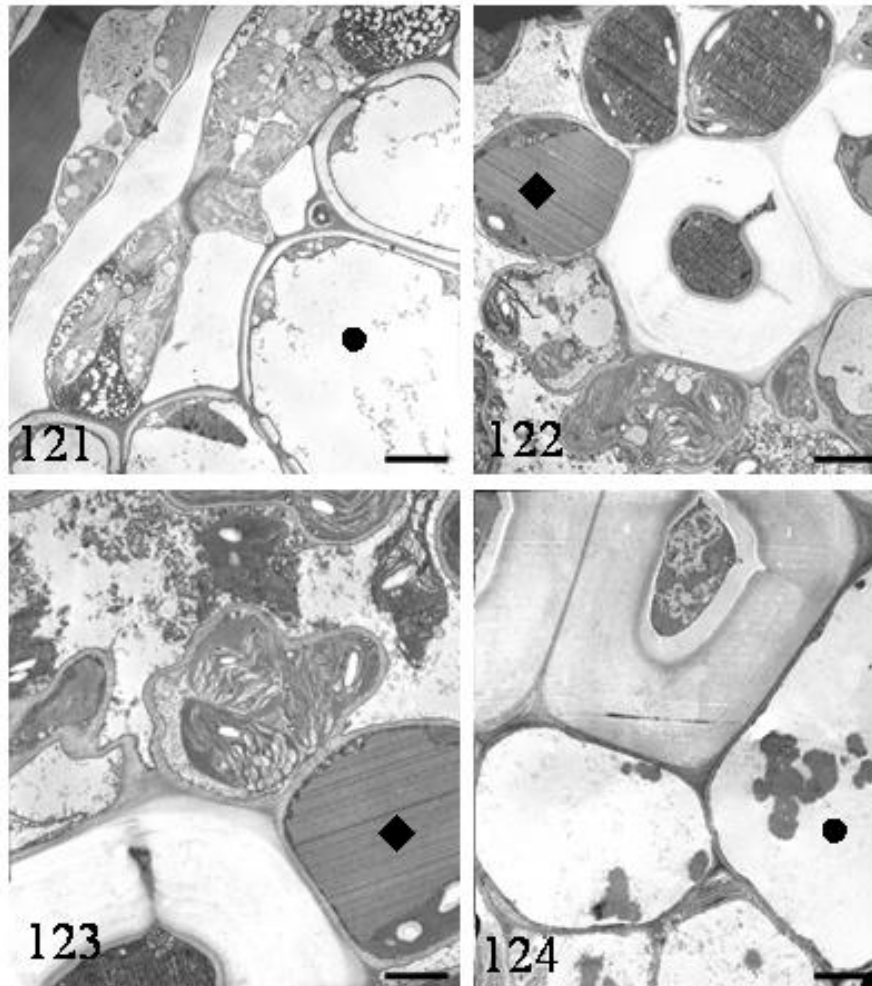


116

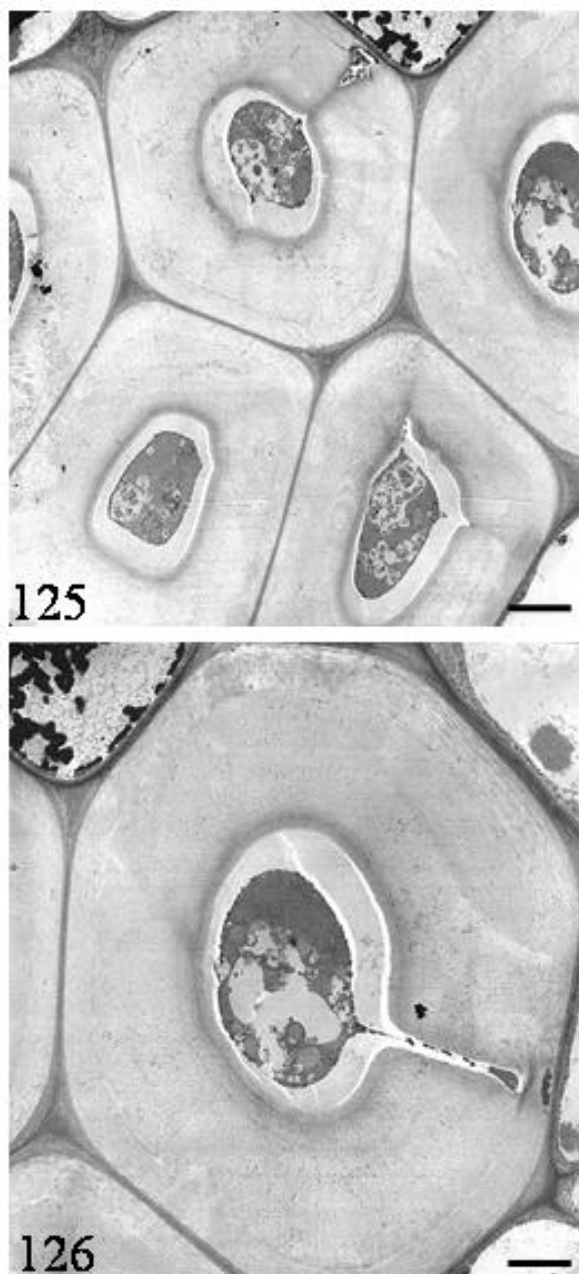
Figuras 115-116- Secção transversal de folha totalmente expandida de *Croton floribundus*. 115- Microscopia óptica de campo claro mostrando teste histoquímico com o reagente de cloreto férrico evidenciando a presença de compostos fenólicos nas células do parênquima lacunoso e cristais de oxalato de cálcio (seta). 116- Microscopia eletrônica de varredura mostrando cristais de oxalato de cálcio nas células do parênquima paliádico. Figura 115 barra = 50 μm , 116 barra = 10 μm .



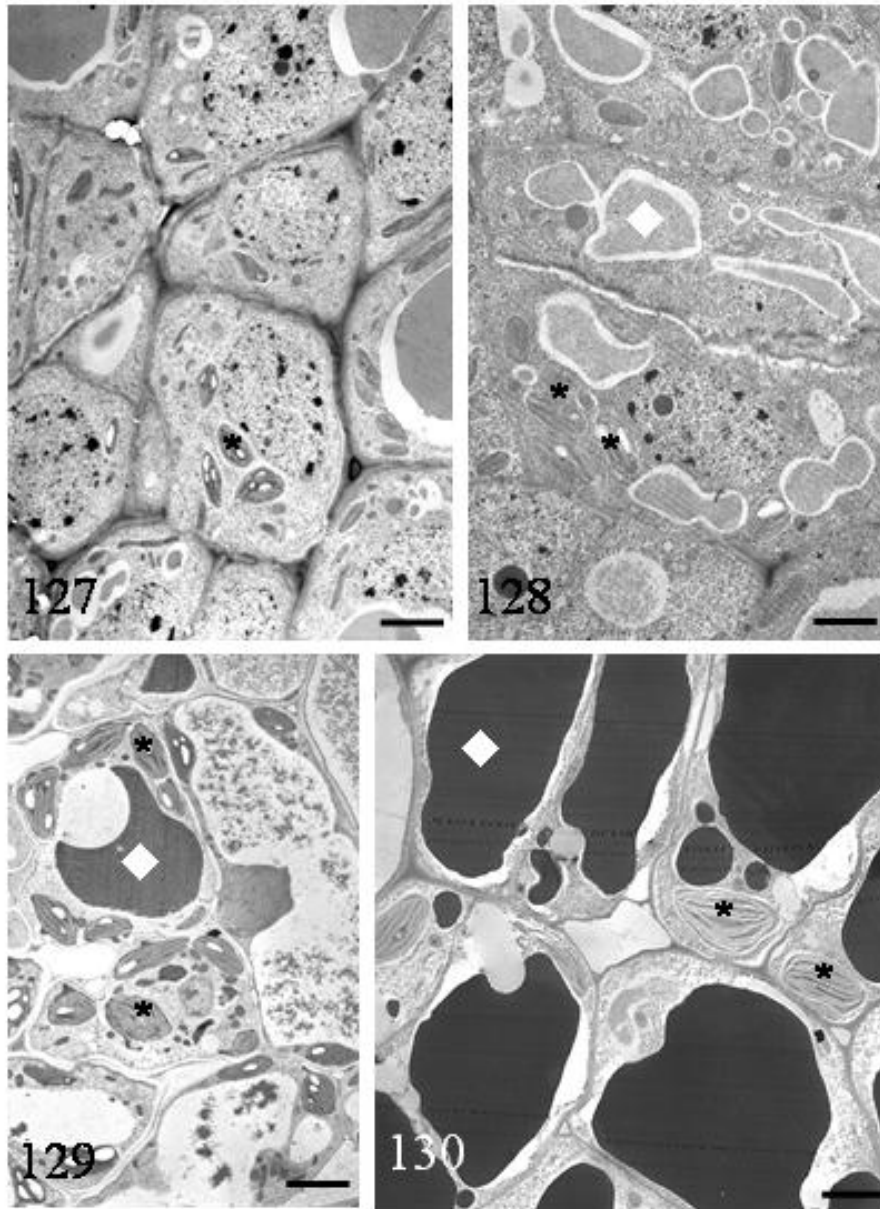
Figuras 117-120- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando corte paradérmico de folhas de *Craton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento. 117- Células epidérmicas. 118- início do espessamento secundário da parede de células próximas ao tricoma (seta). 119 e 120- Espessamento da parede e início da degeneração de organelas citoplasmáticas (seta). Figura 117 barra = 2,5 μm , 118 barra= 1,7 μm , 119 e 120 barra= 0,7 μm e 1,3 μm , respectivamente.



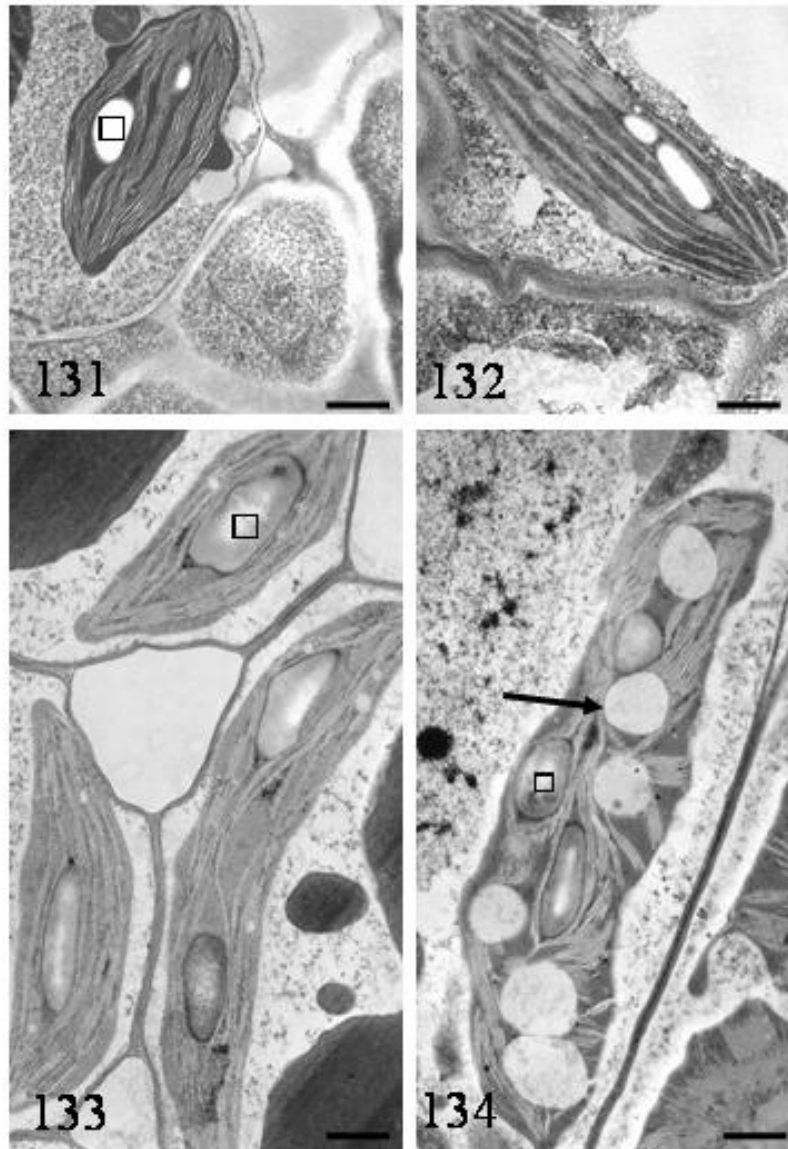
Figuras 121-124- Microscopia eletrônica de transmissão em secção da folha totalmente expandida de *Croton floribundus*. 121- Corte transversal mostrando as células próximas do tricoma sem conteúdo citoplasmático (●). 122 e 123- Corte paradérmico, mostrando esclereídes e células adjacentes com conteúdo eletrondenso (◆). 124- Detalhe da célula adjacente ao esclereíde sem conteúdo citoplasmático (●). Figura 121 barra = 3,8µm, 122 barra = 3,8µm, 123 2,3µm, 124 barra = 2,5 µm.



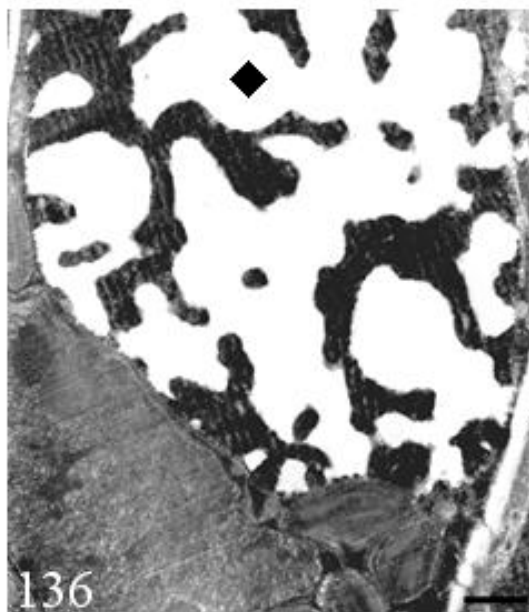
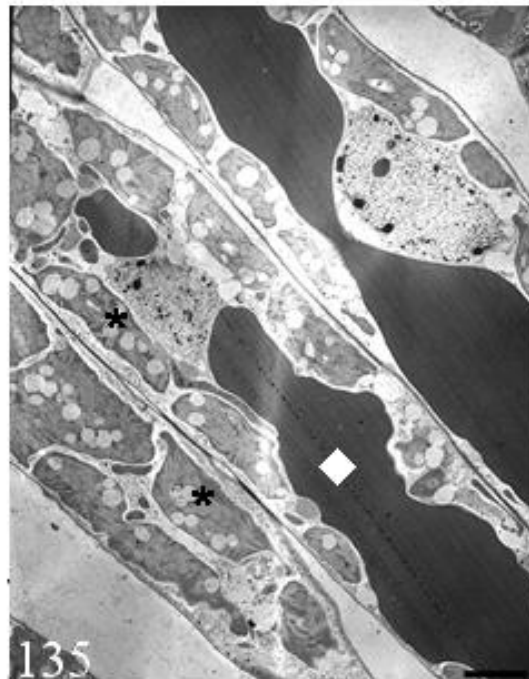
Figuras 125-126- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando corte paradémico de *Croton floribundus*. 125- Feixes de esclereídes que circundam o tricoma. 126- Detalhe de esclereíde mostrando pontuação. Figura 125 barra = 2,6 μm , 126 barra = 1,7 μm .



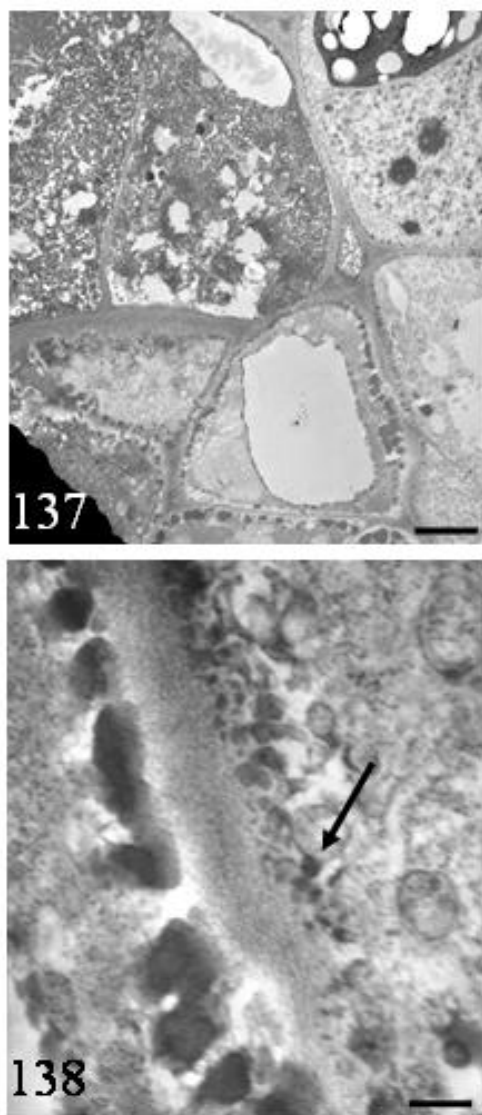
Figuras 127-130- Microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal da folha de *Croton floribundus* em diferentes estádios do desenvolvimento. 127 e 128- Mesófilo de folhas jovens, evidenciando citoplasma denso com vacúolo preenchido por substâncias eletrondensas (◆) e numerosos cloroplastos (*). 129- início da diferenciação das células parenquimáticas, vacúolo (◆) e cloroplastos (*). 130- detalhe de células parenquimáticas de folhas no estágio intermediário do desenvolvimento, evidenciando no vacúolo aumento no acúmulo de substâncias eletrondensas (◆), cloroplastos (*). Figura 127 barra= 2,5 μm , 128 barra=1,1 μm , 129 barra = 4,4 μm , 130 barra =1,6 μm .



Figuras 131-134. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando cloroplastos da folha em diferentes estádios do desenvolvimento de *Crown floribundus*. 131 e 132- Corte transversal da folha jovem mostrando cloroplasto com inclusões de grãos de amido (□). 133- Detalhe de cloroplasto de célula parenquimática de folha em estágio intermediário do desenvolvimento, mostrando aumento das dimensões dos grãos de amido (□). 134- Cloroplasto de célula parenquimática de folha adulta evidenciando plastoglóbulo (seta) e inclusões de grãos de amido (□). Figura 131 barra = 0,9 μm , 132 barra = 0,35 μm , 133 barra = 0,6 μm , 134 barra = 0,75 μm .



Figuras 135-136- Microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal da folha totalmente expandida de *Croton floribundus*. 135- Corte ultrafino do parênquima paliçádico, mostrando vacúolo preenchido de substâncias eletrondensas (◆) e inúmeros cloroplastos (*). 136- Corte ultrafino do parênquima paliçádico, evidenciando o vacúolo contendo substâncias eletrondensas (◆). Figura 135 barra = 2,5 μm , 136 barra = 1,0 μm .



Figuras 137-138- Microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal da folha totalmente expandida de *Croton floribundus*. 137- Células parenquimáticas. 138- Detalhe de vesículas com substâncias eltrondensas (seta). Figura 137 barra = 1,3 μm , 138 barra = 0,2 μm .

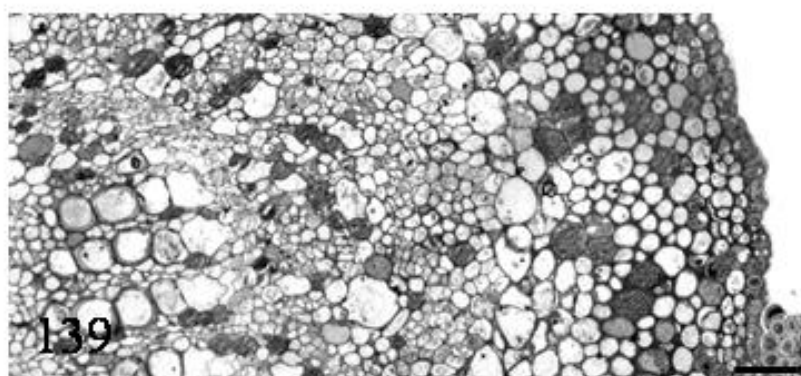
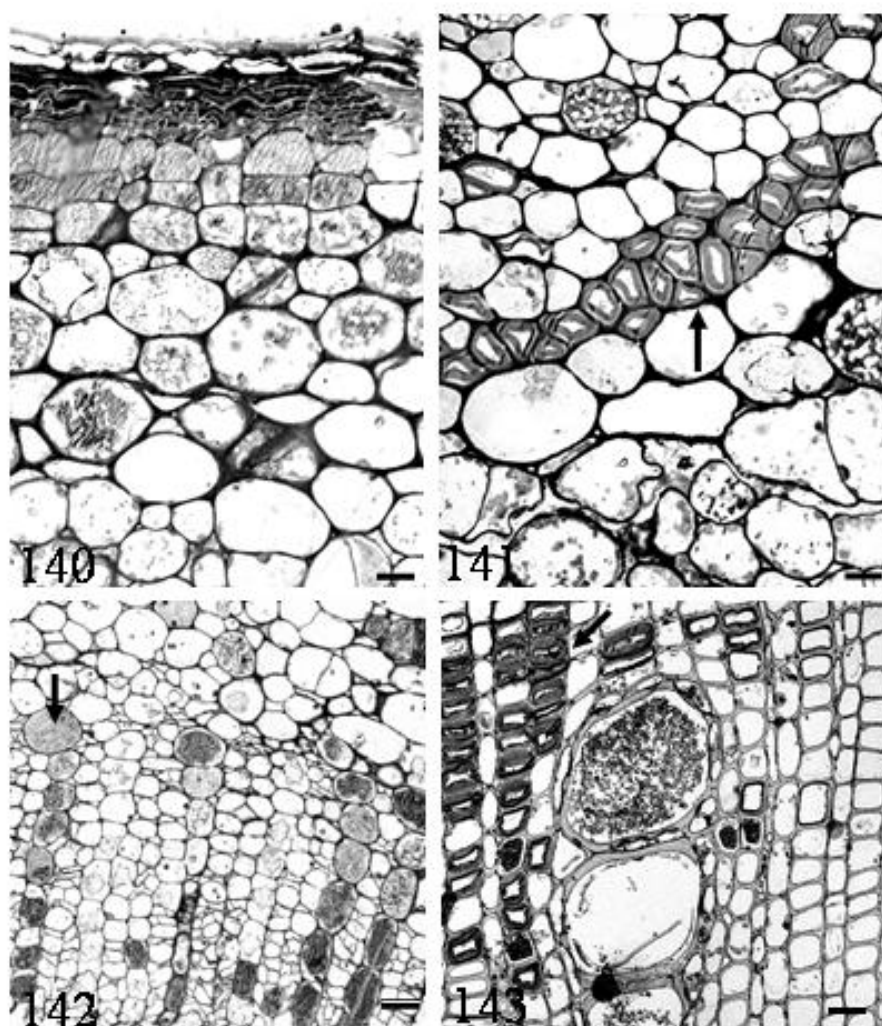
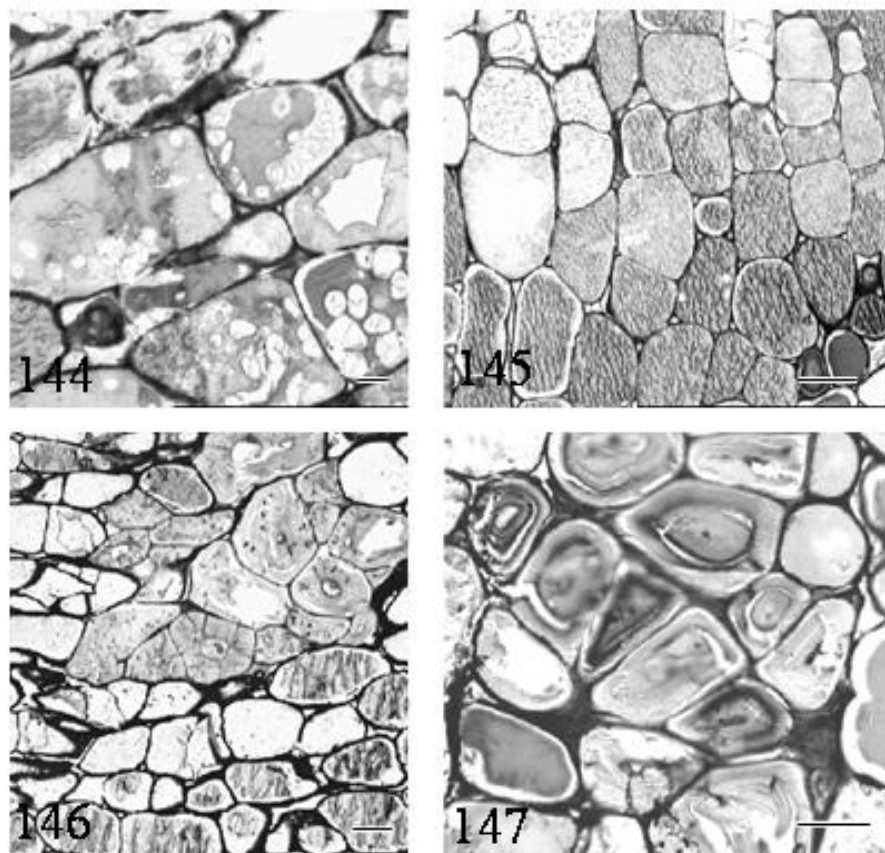


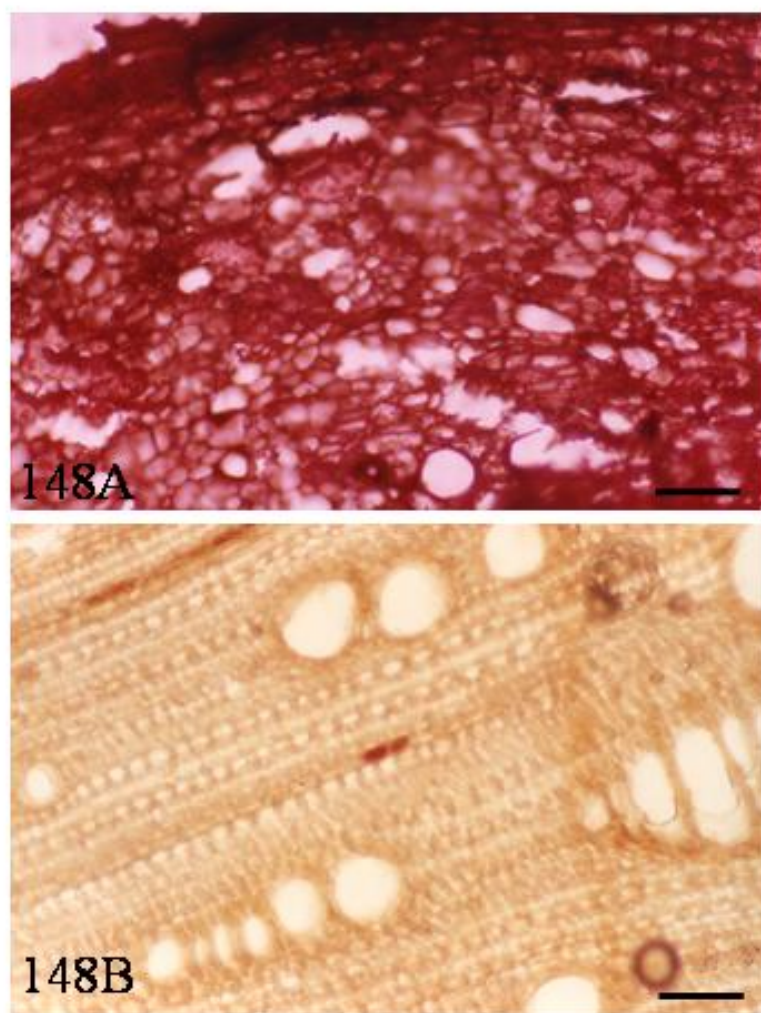
Figura 139- Microscopia óptica de campo claro do caule de *Croton floribundus*.
Corte transversal do caule primário barra = 10 μm .



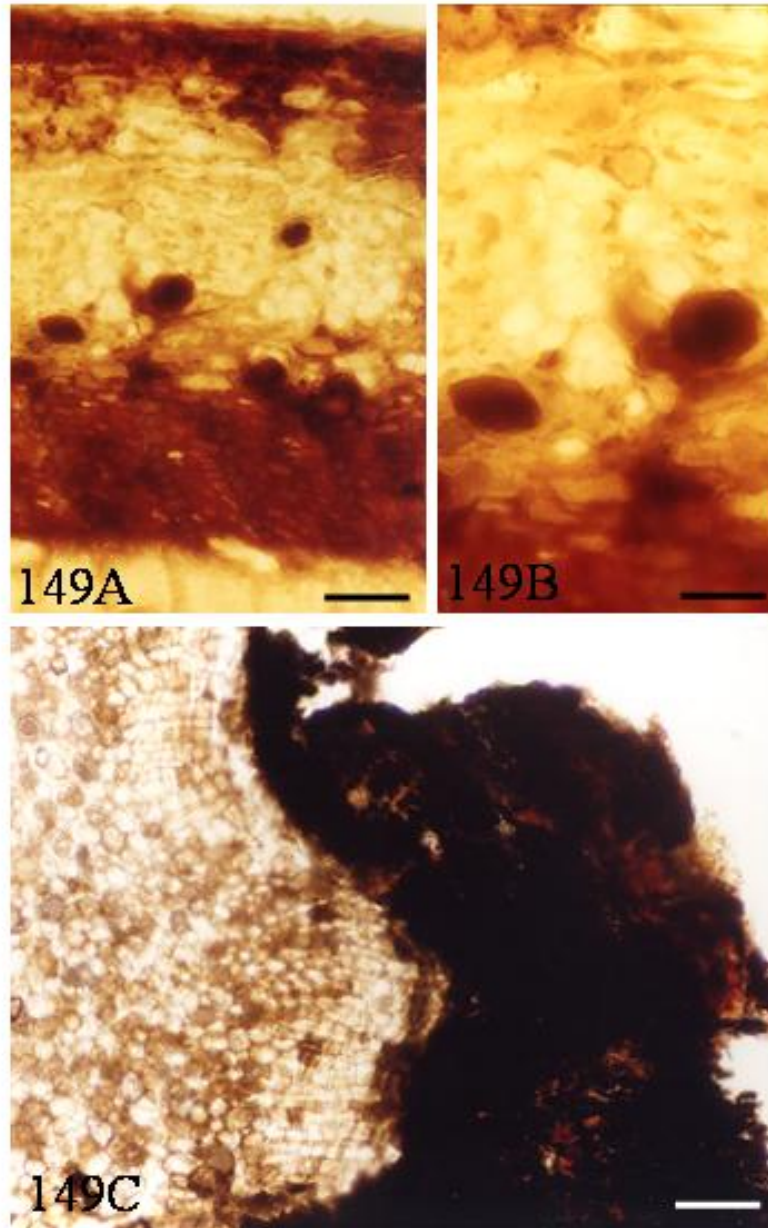
Figuras 140-143- Microscopia óptica de campo claro em secção transversal do caule secundário de *Coton floribundus*. 140- Células da periderme. 141- Detalhe de fibras extraxilemáticas (seta). 142- Detalhe de células do parênquima axial contendo acúmulo de substâncias eletrondensas (seta). 143- Detalhe do xilema mostrando elemento de vaso e fibras gelatinosas (seta). Figuras 140-143 barra = 10µm.



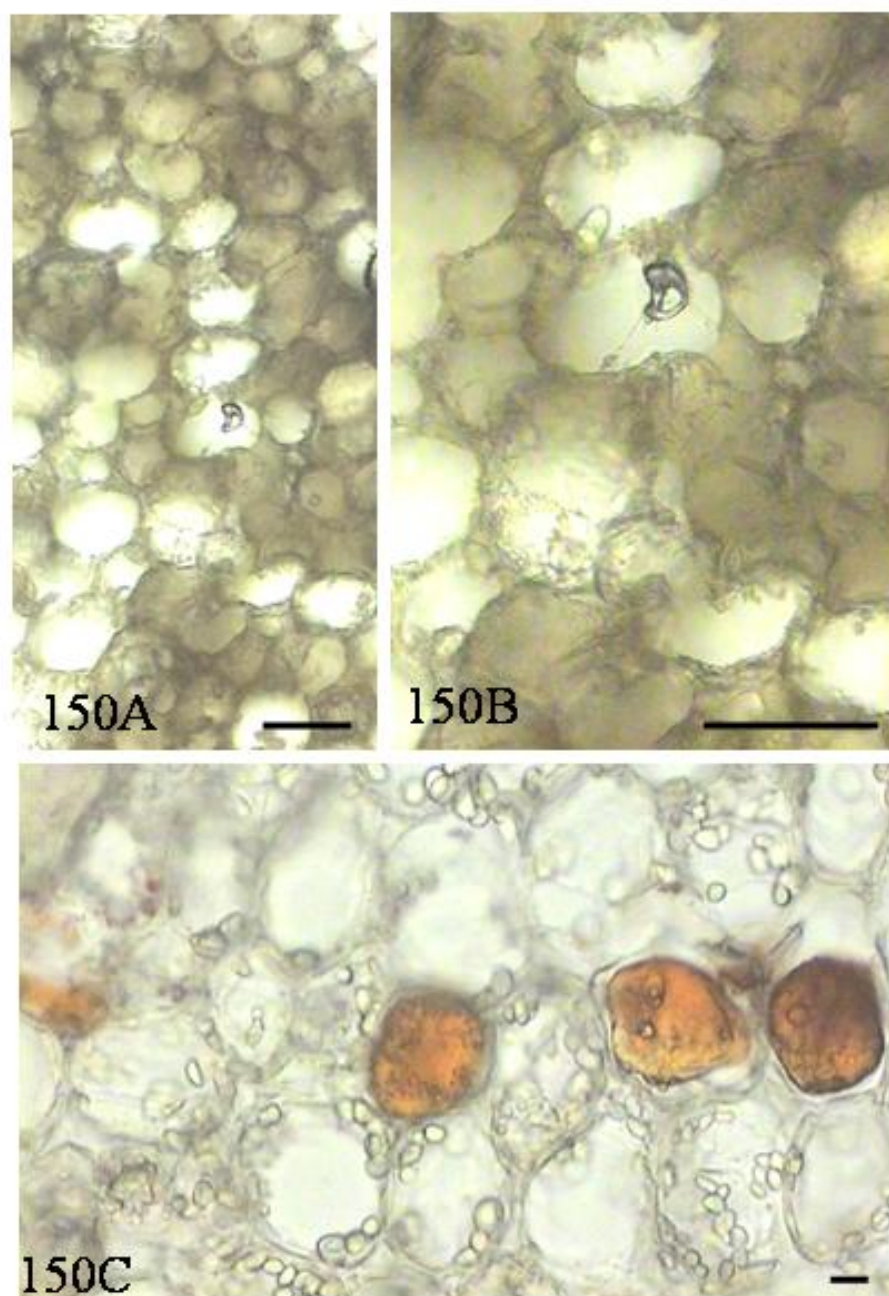
Figuras 144-147- Microscopia óptica de campo claro de corte transversal de caule secundário de *Croton floribundus*. 144 e 145- Depósito de substâncias eletrondensas no parênquima cortical. 146 e 147- Detalhe de um feixe de fibras extraxilemáticas do caule secundário. Figuras 144-147 barra = 10 μ m.



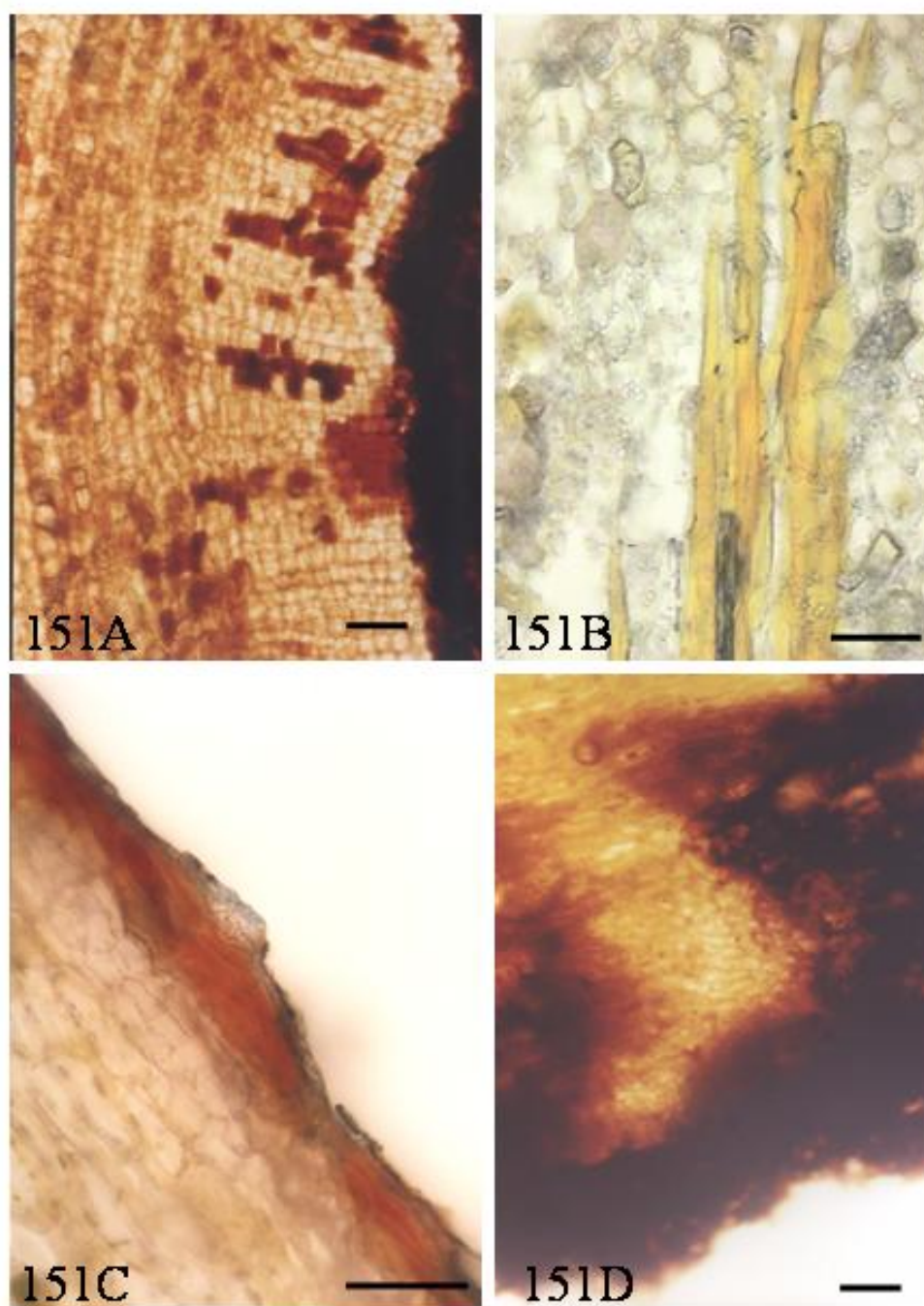
Figuras 148A-B- Microscopia óptica de campo claro mostrando testes histoquímicos em corte transversal do caule de *Croton floribundus*. 148 A- Reagente de vanilina sulfúrica evidenciando a presença de terpenos no parênquima cortical e epiderme. 148B- Reagente de Reeve evidenciando a presença de substâncias fenólicas no raio do xilema. Figuras 148A e 148B barra= 50µm.



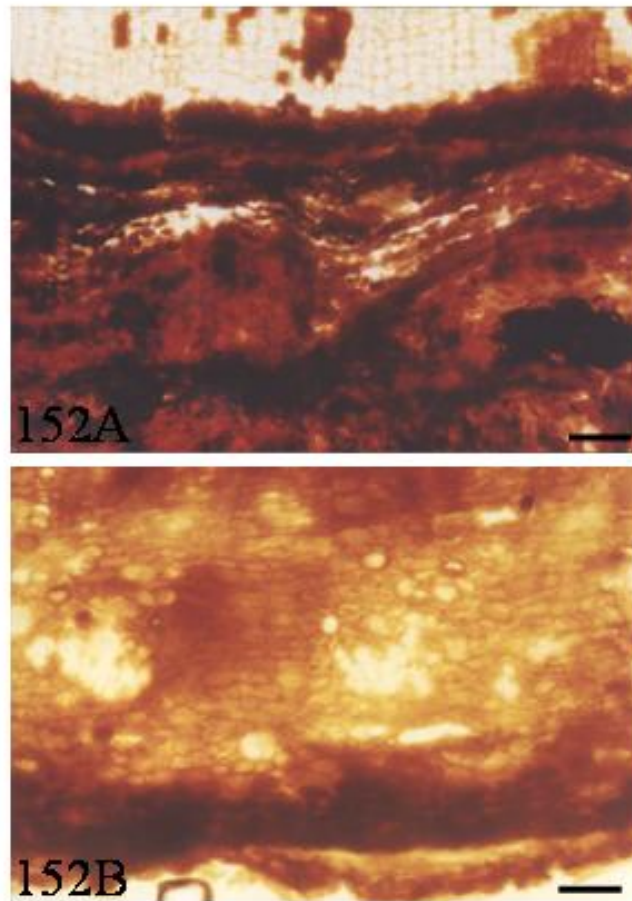
Figuras 149A-C- Microscopia óptica de campo claro em corte transversal do caule mostrando a presença de substâncias fenólicas nas células da periderme, células do parênquima cortical, evidenciadas através de testes histoquímicos em *Croton floribundus*. 149A e 149B- Reagente de dicromato de potássio. 149C- Reagente de cloreto férrico. Figuras 149A e 149C barra= 50µm, 149B barra= 100µm.



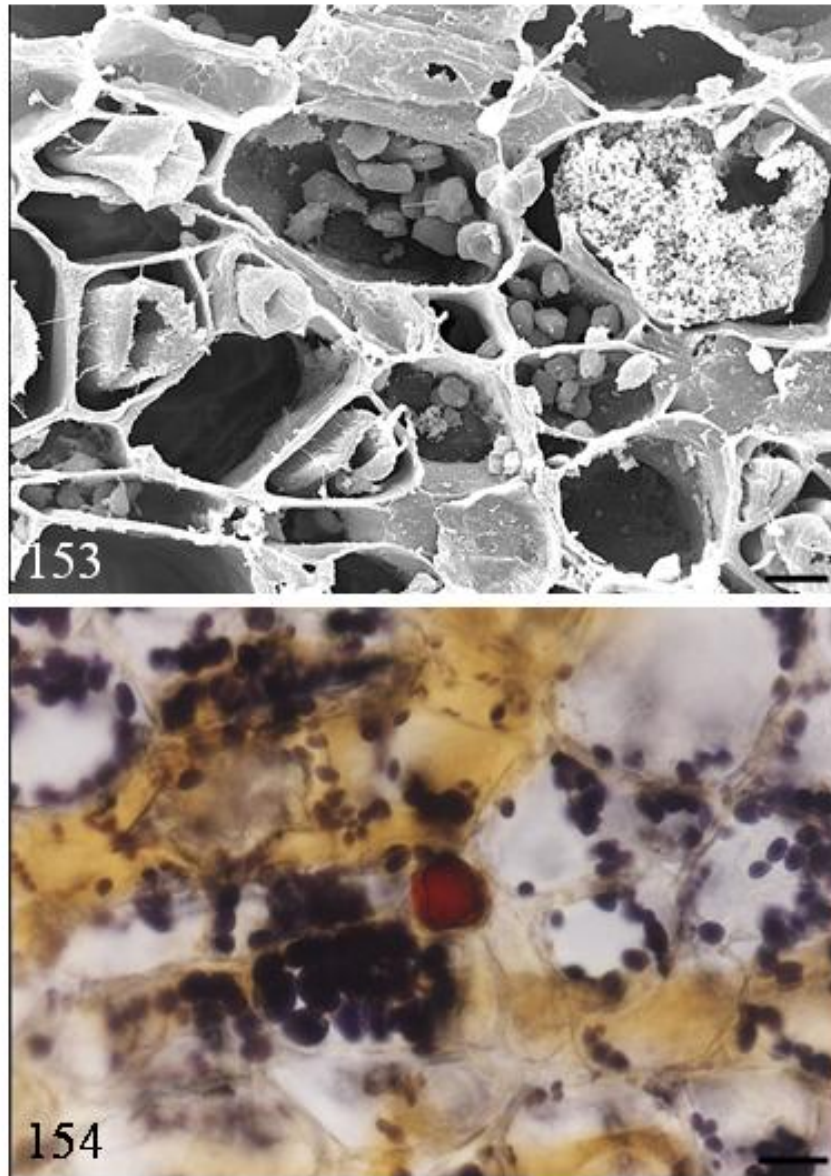
Figuras 150A-C- Microscopia óptica de campo claro em corte transversal do caule mostrando testes histoquímicos em *Croton floribundus*. 150A e 150B- Detecção de substâncias fenólicas do caule secundário através da reação de cloreto férrico. 150C – Reação de Sudan IV, evidenciando a presença de lipídios nas células do parênquima cortical. Figuras 150A, 150B e 150C barra = 10 μm .



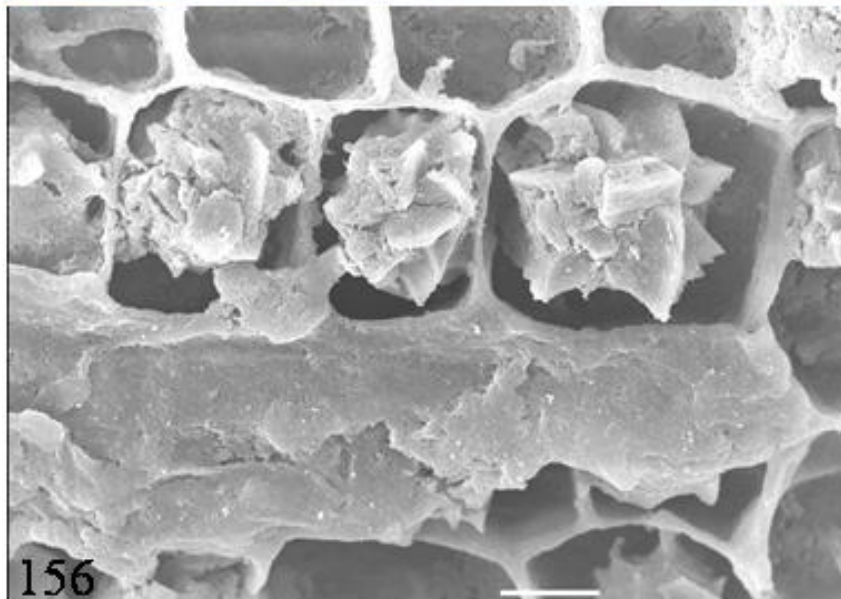
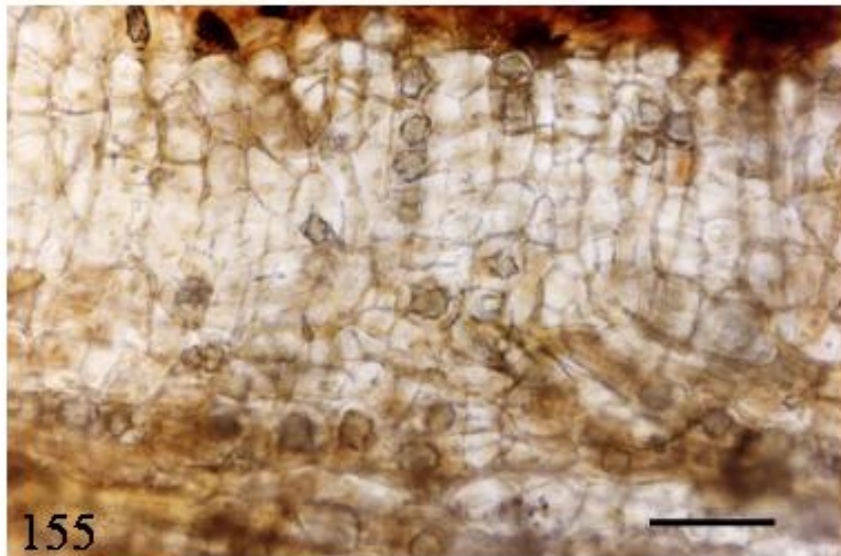
Figuras 151A-D- Microscopia óptica de campo claro em secções transversais do caule mostrando testes histoquímicos em *Croton floribundus*. 151A- Reação de cloreto fêrrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos no parênquima cortical e periderme. 151B- Reação de 2-4 dinitrofenilhidrazina, evidenciando a presença de terpenos nos laticíferos. 151C- Reação de Sudan IV evidenciando deposição lipídica sobre as células epidérmicas. 151D- Reagente de Dragendorff evidenciando a presença de alcalóides na periderme. Figuras 151A, 151C e 151D barra= 50µm, 151B barra= 20µm.



Figuras 152A-B. Microscopia óptica de campo claro em secção transversal do caule mostrando testes histoquímicos em *Croton floribundus*. 152A- Reagente de Dragendorff, detalhe da periderme evidenciando a presença de alcalóide. 152B- dicromato de potássio, detalhe do parênquima cortical e periderme com marcação positiva para compostos fenólicos. Figuras 152A e 152B barra= 50µm.



Figuras 153-154. Secção transversal do caule primário de *Croton floribundus*. 153- Microscopia eletrônica de varredura mostrando região do parênquima cortical contendo grãos de amido. 154- Microscopia óptica de campo claro mostrando teste histoquímico evidenciando grãos de amido corados pelo reagente de lugol nas células do parênquima cortical. Figura 153 barra=10µm, 154 barra= 20 µm.



Figuras 155-156- Seção transversal do caule secundário de *Croton floribundus*. 155- Microscopia óptica de campo claro mostrando teste histoquímico evidenciando a presença de cristais de oxalato de cálcio distribuídos no parênquima cortical. 156- Microscopia eletrônica de varredura mostrando drusas de oxalato de cálcio nas células do parênquima cortical. Figura 155 barra= 25 μm , 156 barra= 10 μm .

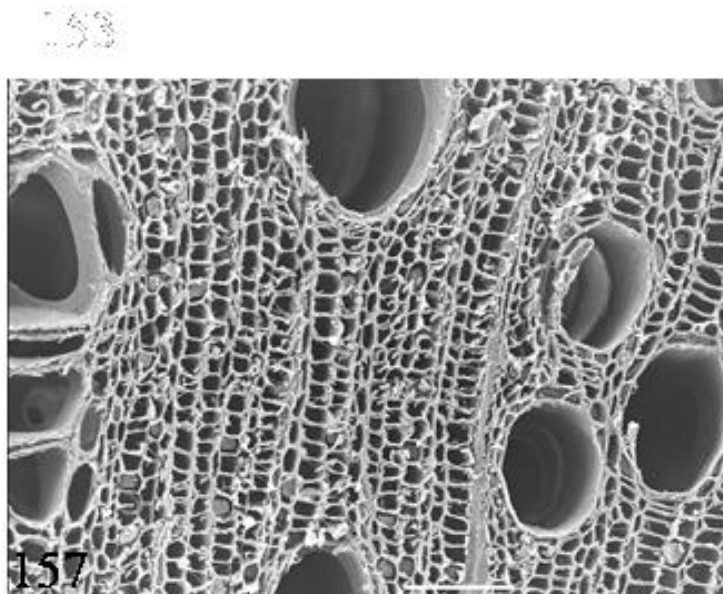
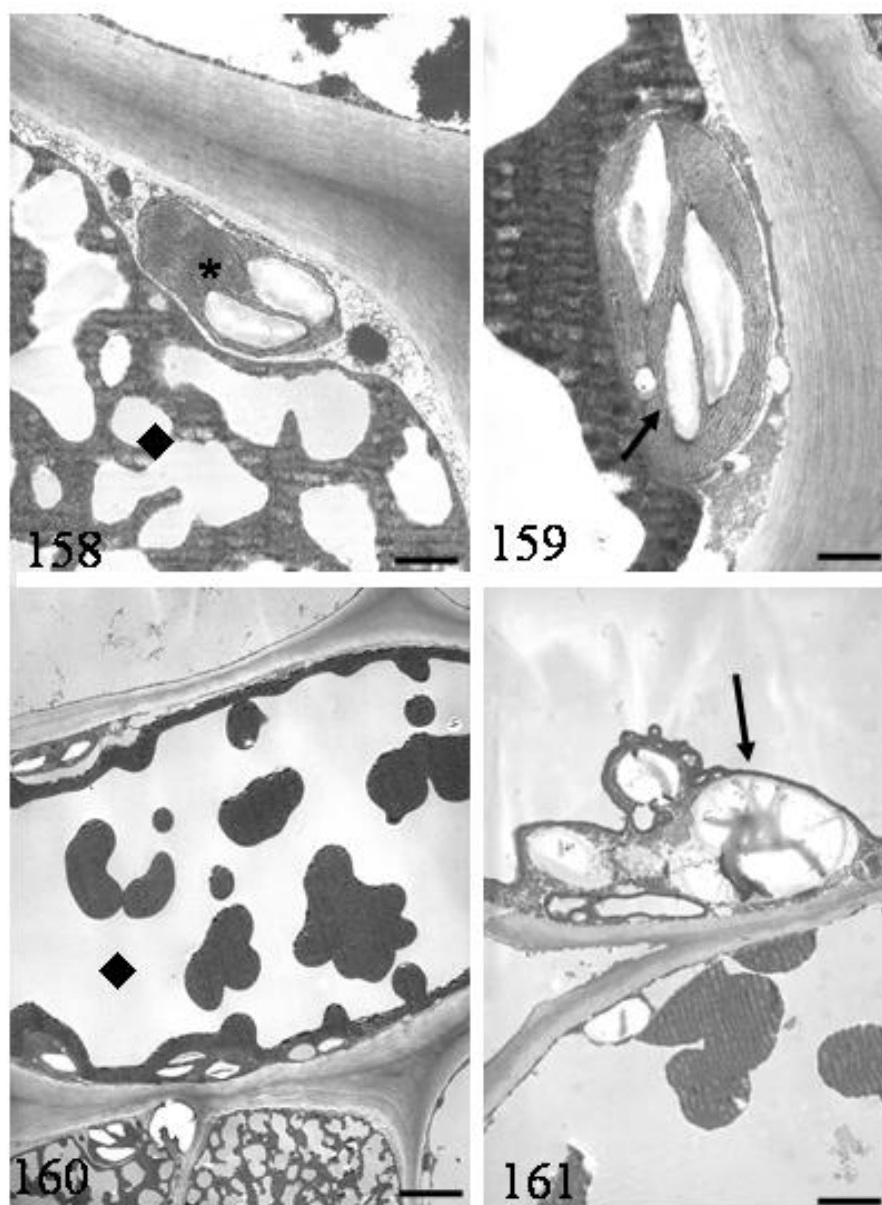
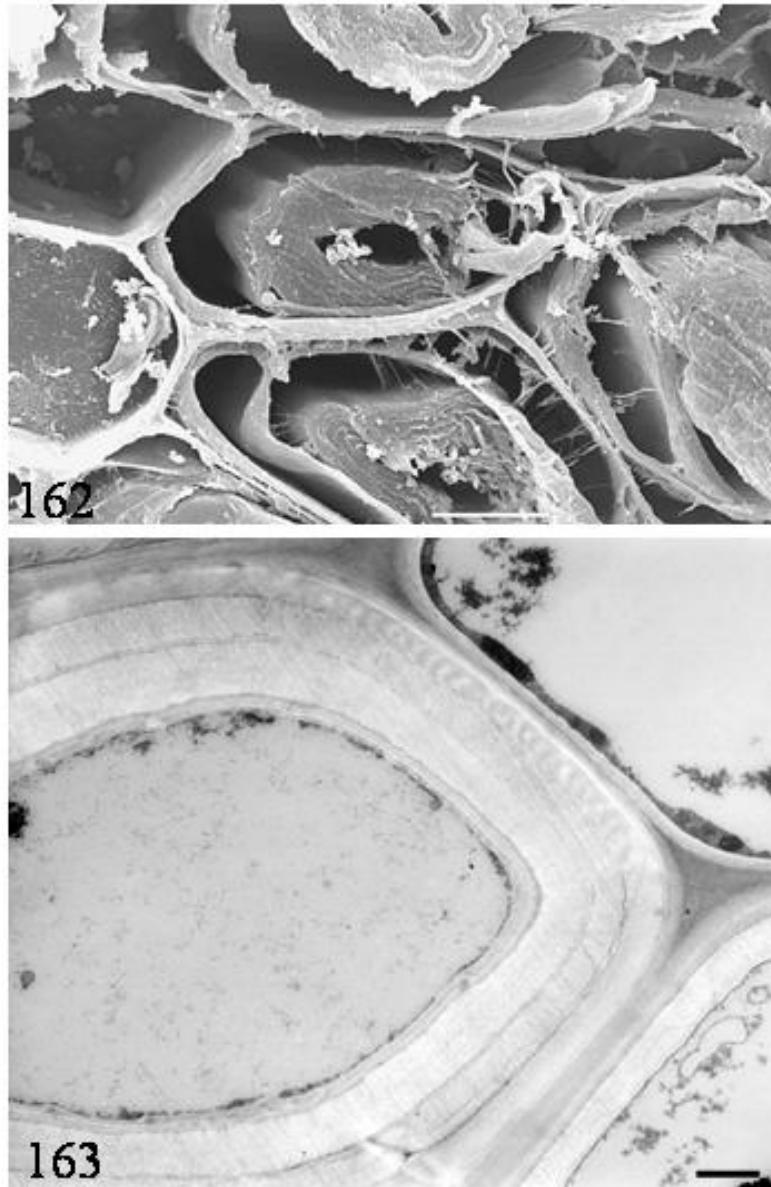


Figura 157- Microscopia eletrônica de varredura mostrando corte transversal do caule secundário de *Croton floribundus*. 157- Detalhe do xilema mostrando elementos de vaso e fibras barra= 100µm.



Figuras 158-161 - Microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal do caule de *Croton floribundus*. 158- Células do parênquima cortical de caule jovem, evidenciando cloroplasto (*) e vacúolo preenchido por substâncias eletrondensas (◆). 159- detalhe de cloroplasto de células jovens, evidenciando a presença de grãos de amido (seta). 160 - Células do parênquima cortical evidenciando a presença de vacúolo bem desenvolvido preenchido por substâncias eletrondensas (◆). 161 - Detalhe de cloroplasto, evidenciando o estroma ocupado por grãos de amido (seta). Figura 158 barra = 1,0 μm , 159 barra = 0,8 μm , 160 barra = 4,0 μm , 161 barra = 1,5 μm .



Figuras 162-163- Microscopia eletrônica em secção transversal do caule de *Croton floribundus*. 162- Microscopia eletrônica de varredura mostrando fibras extraxilemáticas no parênquima cortical. 163- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando detalhe da fibra extraxilemática do caule no estágio intermediário do desenvolvimento. Figura 162 barra = 10 μm , 163 barra = 1,1 μm .

6 DISCUSSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos em folhas e caules em diferentes estádios do desenvolvimento em *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus*, as análises anatômicas, ultraestruturais e histoquímicas possibilitaram a caracterização das espécies analisadas, assim como a elucidação dos sítios de acúmulo dos compostos secundários.

Nas folhas de *Croton macrobothrys* e *C. floribundus*, as células epidérmicas, apresentam contorno retangular a poliédrico e paredes retas a ligeiramente sinuosas, a exemplo de outras espécies do gênero (SOLEREDER, 1908; METCALFE e CHALK, 1950). O contorno sinuoso das paredes tem sido atribuído à influência de condições ambientais como a irradiação luminosa e a umidade relativa (ESAU, 1985). Também está relacionada à proteção mecânica (HABERLANDT, 1928), a qual contribuiria para o aumento da rigidez da parede celular, prevenindo um colapso da célula em plantas submetidas ao déficit hídrico. A sinuosidade das paredes de *C. floribundus* é maior do que aquelas observadas em *C. macrobothrys*, sugerindo que esta espécie esteja mais adaptada a alterações ambientais.

A deposição de ceras epicuticulares com diferentes características é comum em vegetais e a ornamentação cuticular é considerada um caráter diagnóstico para separar espécies (ESAU, 1977; METCALFE e CHALK, 1979; JUNIPER *et al.*, 1983). As ceras epicuticulares de ambas as espécies estudadas são lisas ou em forma de filme. No entanto, em *C. macrobothrys*, possuem ornamentação cuticular com arranjo estriado sobre as células estomáticas. O espessamento da cutícula e das ceras epicuticulares, observado nas folhas totalmente expandidas de ambas as espécies estudadas podem

representar uma barreira contra agentes bióticos (MARTIN e JUNIPER, 1970 *apud* FURLAN, 1998; OLIVEIRA *et al*, 1999) ou aos efeitos danosos de agentes abióticos (JENKS e ASHWORTH 1999; HELBSING *et al.*, 2000; STENGLEIN *et al.*, 2005; BRINGE *et al.*, 2006).

As folhas completamente expandidas de *C. floribundus* e *C. macrobothrys* são hipoestomáticas, como a maioria das espécies da subfamília *Crotonoideae* (METCALFE e CHALK, 1965), com estômatos do tipo paracítico. Estômatos do tipo paracítico, foi proposto para *C. lanjouwensis*, embora nesta espécie a lâmina foliar seja anfiestomática (AGUIAR *et al.*, 2000).

Os idioblastos com conteúdo lipídico localizados na epiderme abaxial de *C. floribundus* também foram observados em *C. rhamnifolius* (MENEZES, *et al.*, 2003) e *Croton monanthogynus*, onde foram denominados células secretoras crateriformes (METCALFE e CHALK, 1965).

Os tricomas na família Euphorbiaceae possuem uma grande variedade de tipos e formas. Os tricomas tectores, podem ser simples unicelulares e multicelulares, a exemplo daqueles encontrados em espécies dos gêneros *Dalechampia*, *Cnidoscolus* e *Croton* (METCALFE e CHALK, 1965). A grande diversidade de tricomas observada no gênero *Croton* tem sido utilizada para a delimitação de diferentes *taxa* (FROEMBLING, 1896; SOLEREDER, 1908; METCALFE e CHALK, 1950; WEBSTER *et al.*, 1996).

A lâmina foliar das espécies estudadas é densamente pilosa em ambas as faces, nos estádios iniciais do desenvolvimento. Nas folhas totalmente expandidas de *C. macrobothrys*, a densidade dos tricomas sofre redução na face abaxial, desaparecendo completamente na superfície adaxial. O decréscimo da densidade de tricomas durante o desenvolvimento foliar foi observado em outras plantas (KARABOURNIOTIS e FASSEAS, 1996). Ao contrário de *C. macrobothrys*, uma grande quantidade de tricomas foi observada em ambas as faces das folhas totalmente expandidas de *C. floribundus*.

A distribuição dos tricomas nas folhas jovens de ambas as espécies, embora não quantificada, é aparentemente homogênea em ambas as faces adaxial e abaxial, assim como foi observado em *C. urucurana* (ORTIZ *et al.*, 2002), *C. salutaris* (ORTIZ *et al.*, 2003) e *C. compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003). No entanto, em espécies como *C. lanjouwensis*, os tricomas da face abaxial localizam-se, principalmente, na região apical da lâmina foliar (AGUIAR *et al.*, 2000). O aumento na densidade dos tricomas que recobrem a epiderme foliar tem sido considerado uma barreira física para a redução de herbivoria (Press, 1999), e relacionado ao maior grau de refletância da luz, por reduzir a quantidade de radiação solar (KARABOURNIOTIS *et al.*, 1992; CORSI e BOTTEGA, 1999), a redução da temperatura e ao controle da transpiração (KARABOURNIOTIS e BORNMAN, 1999).

Sugere-se que, o papel dos tricomas na manutenção do teor de água seja menos importante do que na proteção contra a excessiva radiação ultravioleta (KARABOURNIOTIS e BORNMAN, 1999). Neste caso, o seu papel estaria relacionado com o acúmulo de polifenóis (TATTINI *et al.*, 2000). O acúmulo de fenólicos foi observado nos tricomas de em ambas as espécies de *Croton* estudadas.

Nos estádios iniciais do desenvolvimento, a epiderme adaxial da lâmina foliar de *C. macrobothrys* encontra-se revestida por tricomas dendríticos, formados por pedúnculo multisseriado e região apical multirradiada com uma célula central bem desenvolvida. Na epiderme abaxial, os tricomas são do tipo estrelado, apresentando pedúnculo multisseriado e região apical multirradiada. Em *C. floribundus*, a epiderme adaxial das folhas, nos estádios iniciais do desenvolvimento, apresenta tricomas aciculares, com a célula central de parede espessada e células adjacentes formando uma base multisseriada. Na face abaxial a epiderme desenvolve tricomas tectores, do tipo leptode e tricomas glandulares.

No gênero *Croton*, os tipos de tricoma podem variar de acordo com a espécie. Tricomas do tipo acicular ou dendritico com arranjo multirradiado foram observados na epiderme adaxial das

folhas totalmente expandidas de *C. urucurana* (ORTIZ *et al.*, 2002). Também foram registrados tricomas do tipo escamoso para *C. salutaris* (ORTIZ *et al.*, 2003), dendritico para *C. compressus* (Ortiz *et al.*, 2003) e tipos unicelulares e estrelados para *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003).

Os tricomas do tipo acicular, observados na face adaxial e os do tipo leptode que revestem a face abaxial das folhas de *C. floribundus* apresentam-se conectados por esclereídes. Este arranjo também foi observado em *C. rhamnifolius* (MENEZES, *et al.*, 2003), *Croton compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003) e outras espécies do gênero (METCALFE e CHALK, 1965). Acredita-se que a associação dos tricomas com esclereídes represente uma estratégia alternativa de absorção ou translocação de água, além da proteção contra predadores (MENEZES *et al.*, 2003). As numerosas pontoações observadas nas células esclerenquimáticas de *C. floribundus*, assim como aquelas registradas em *C. compressus* (ORTIZ *et al.*, 2003) parecem contribuir para o transporte da água absorvida e sugerem a associação entre tricomas e esclereídes como uma via alternativa para a absorção de água nas espécies do gênero *Croton*. A presença de uma bainha parenquimática aclorofilada, envolvendo as esclereídes, a exemplo do que ocorre nas bainhas dos feixes vasculares, reforçam essa suposição. O papel dos tricomas na absorção de água foi observado nas espécies da família Bromeliaceae, onde os tricomas também participam na absorção de nutrientes (BENZING *et al.*, 1976; BENZ e MARTIN, 2005),

O desenvolvimento dos tricomas é assincrônico, sendo observados tricomas em diferentes fases de maturação de acordo com estágio de desenvolvimento foliar. Duas formas de desenvolvimento podem ocorrer durante a formação dos tricomas. No primeiro caso, o número final dos tricomas é estabelecido nos estádios iniciais de diferenciação da folhas (Ascensão e Pais, 1987), enquanto no outro, novos tricomas são formados durante todos os estádios do desenvolvimento foliar (MAFFEI *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 2000).

A ontogenia dos tricomas tectores foi acompanhada em ambas as espécies e verificou-se que o desenvolvimento dos tricomas ocorre de duas formas distintas: originando-se a partir de divisões anticlinais e periclinais assincrônicas formando, inicialmente, uma célula apical diferenciada das demais, ou através de divisões sincrônicas, originando uma protrusão epidérmica. Nesta protrusão, formada por um conjunto de células indiferenciadas, é observado crescimento da célula central, originando a célula apical diferenciada. Em ambos os tipos de desenvolvimento, as células parenquimáticas subepidérmicas contribuem para a formação do pedúnculo e parte das células que irão compor os raios.

Alterações estruturais como espessamento da parede e redução do lúmen celular, podem ser observadas nas células apicais radiais dos tricomas das espécies estudadas, semelhante ao que foi observado em *C. lanjouwensis* (AGUIAR *et al.*, 2000).

As células apicais radiais e pedunculares dos tricomas, ocasionalmente, apresentam coloração levemente ferrugínea, assim como, observado nos tricomas do eixo vegetativo e reprodutivo de *Croton rhamnifolius* e *Croton rhamnifolioides* (RANDAU *et al.*, 2004). Testes histoquímicos demonstraram tratar-se de compostos de natureza fenólica, acumulados nas células radiais e pedunculares.

Tricomas glandulares são encontrados somente na face adaxial de *Croton floribundus*. Os estudos ontogenéticos evidenciaram que estes têm início a partir de uma única célula epidérmica que sofre aumento e, posteriormente diferencia-se em uma célula secretora. Os tricomas glandulares podem apresentar, entre outras funções, atração de polinizadores e proteção contra herbivoria, dependendo das substâncias que acumulam e secretam, embora a função específica de cada tipo de tricoma glandular não seja totalmente conhecida (CORSI e BOTTEGA, 1999, ASCENSÃO *et al.*, 1999).

As análises histoquímicas evidenciaram a presença de conteúdo lipídico na célula apical do tricoma glandular de *Croton floribundus*. O acúmulo de lipídios pode estar relacionado com o seu papel na produção de sinalizadores de mecanismo de defesa, onde o ácido jasmônico exerce importante função (LI *et al.*, 2004). Propõe-se que o acúmulo de componentes tóxicos na superfície da planta seja uma estratégia defesa contra insetos, patógenos e herbívoros, de forma que os exsudatos sejam posicionados de forma ideal para aumentar a primeira linha de defesa contra o ataque de organismos (WAGNER *et al.*, 2004).

A estrutura dorsiventral também foi observada por outros autores nas espécies da família Euphorbiaceae (SOLEREDER, 1908; METCALFE e CHALK, 1950, 1979). Em *C. macrobothrys* o mesofilo é dorsiventral com células paliçádicas alongadas e compactadas e parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares, enquanto em *C. floribundus* as células do parênquima paliçádico são mais longas e os estratos do parênquima lacunoso apresentam-se em menor número. A organização dorsiventral aliada ao caráter hipostomático evidencia o caráter mesofítico das espécies.

C. macrobothrys e *C. floribundus*, assim como previamente observado em *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003), apresentam cristais de oxalato de cálcio, sob a forma de drusas, entre as células do parênquima paliçádico, entretanto, em *C. macrobothrys* sua ocorrência é menos freqüente. Além de drusas, as espécies de *Croton* também podem apresentar ráfides e estilóides (METCALFE e CHALK, 1965). Acredita-se que a formação de oxalato de cálcio em tecidos vegetais seja decorrente da possível remoção de oxalato acumulado em quantidades tóxicas, assim como da sua utilização para a manutenção do equilíbrio iônico (SUGIMURA *et al.*, 1999). Outrossim, a presença de cristais de oxalato de cálcio é justificada por serem considerados produtos do metabolismo, cuja principal função é armazenar o cálcio removido do sistema, pois, além de estarem associados à

defesa da planta contra a herbivoria, teriam o papel na reserva de cálcio (FRANCESCHI e HORNER, 1980).

Nas folhas completamente desenvolvidas de *C. macrobothrys*, os idioblastos contendo inclusões lipídicas são observados no parênquima lacunoso, assim como evidenciado nas folhas de *C. matourensis* (OHANA, *et al.*, 2003) e em *C. salutaris* (ORTIZ *et al.*, 2003). As células secretoras contendo óleo ou resinas que ocorrem na superfície ou imersas no mesofilo das espécies de *Croton* são importantes caracteres utilizados para fins diagnósticos em estudos taxonômicos (METCALFE e CHALK, 1965) e foi considerado um caráter distintivo para as duas espécies.

Idioblastos taníferos estão presentes no mesofilo das duas espécies estudadas, apresentando maior frequência nas células do parênquima paliçádico característica comum a famílias como Ampelidaceae, Crassulaceae, Ericaceae, Leguminosae (ESAU, 1977).

Na nervura principal de folhas completamente desenvolvidas de *Croton macrobothrys* observou-se a redução no número de células e do conteúdo fenólico. Essa redução sugere que o acúmulo de substâncias fenólicas exerça importante papel contra a herbivoria principalmente nas folhas em estádios iniciais do desenvolvimento, período no qual as células do parênquima e tecidos lignificados ainda encontram-se em fase do desenvolvimento e reduzido desenvolvimento parietal.

As espécies estudadas apresentam feixes vasculares do tipo colateral, semelhante às outras Euphorbiaceae (SOLEREDER, 1908; METCALFE e CHALK, 1950). Os feixes vasculares encontrados no mesofilo de *C. macrobothrys* e *C. floribundus* são circundados por células esclerenquimáticas e parenquimáticas as quais formam extensões de bainha característica, observada somente em algumas espécies do gênero (METCALFE e CHALK, 1965). Estas extensões desempenham função condutora, transportando produtos dos feixes às células epidérmicas (FAHN, 1979).

Tanto em *C. macrobothrys* quanto em *C. floribundus* a região cortical do caule secundário apresenta parênquima desenvolvido com menor quantidade de drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio, quando comparadas ao caule primário, e inúmeros idioblastos contendo taninos distribuídos de forma difusa. Caracteres semelhantes foram observados em *Croton matourensis* (OHANA *et al.*, 2003). O número reduzido de idioblastos contendo cristais e fenóis em estádios avançados de crescimento sugerem que, a formação destas células especializadas ocorra nos primeiros estádios de formação do caule, não havendo aumento no número de células nas fases subseqüentes de desenvolvimento.

As espécies estudadas apresentaram feixes de fibras extraxilemáticas de paredes espessadas polilameladas com numerosas pontuações simples e lúmen reduzido, formando um anel descontínuo, intercalados por células parenquimáticas. A presença de esclereídes foi observada em outras espécies da família Euphorbiaceae, a exemplo de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (LOURO *et al.*, 2003). Em *Hevea brasiliensis*, os esclereídes apresentam paredes espessas polilameladas e ricas em pontuações, distribuindo-se de forma difusa e em feixes da região do floema até as proximidades da periderme (THOMAS, *et al.*, 1995). Tal organização, também foi observada na parede cortical de *C. matourensis* (OHANA *et al.*, 2003). A associação entre a presença de depósitos de polifenóis e substâncias oleosas, assim como, a presença de fibras e a grande extensão da periderme com depósito de suberina, constituem estratégias de proteção desenvolvidas por espécies caducifólias (PAREDES *et al.*, 2001).

Nos raios parenquimáticos das espécies estudadas, observa-se a presença de amido, compostos fenólicos e drusas de oxalato de cálcio, os quais são mais abundante em *C. floribundus*. Cristais localizados nas células dos raios parenquimáticos foram observados em *Croton matourensis* (OHANA *et al.*, 2003). A presença de cristais constitui uma das características da família Euphorbiaceae, sendo freqüentemente utilizada para a distinção entre os gêneros desta família

(OHANA *et al.*, 2003; MENNEGA, 2005). Além dos cristais, o acúmulo de grãos de amido e de compostos fenólicos também pode ser observado na família (METCALFE e CHALK, 1965), a exemplo de *Phyllanthus niruri* (LOURO *et al.*, 2003) e *Micandra inundata* (BERRY *et al.*, 2004).

Em *Hevea brasiliensis*, além do parênquima radial, a presença de conteúdo tânico também foi observada nas células do parênquima axial (THOMAS *et al.*, 1995). Em relação ao acúmulo de amido, propõe-se que estes sejam acumulados pelas células do raio no início do verão, sendo mobilizados no início da primavera (COSTA *et al.*, 2003). Os raios apresentam importante papel no transporte radial de materiais de reservas (VAN BEL 1990; HARMS e SAUTER 1992), na aeração e na regeneração de feridas (THOMAS *et al.*, 1995).

Ambas as espécies estudadas, apresentam xilema com parênquima axial do tipo apotraqueal, o qual é predominantemente encontrado na subfamília *Crotonoideae* (MENNEGA, 2005), sendo também observados em *Micandra inundata* (BERRY *et al.*, 2004).

Fibras libriformes de paredes amorfas ocorrem no xilema e no parênquima medular de ambas as espécies estudadas. No entanto, fibras gelatinosas de paredes secundárias lameladas também foram observadas em *Croton floribundus*. A presença de fibras gelatinosas foi referida para *C. urucurana* (LUCHI, 2004) e espécies do gênero *Euphorbia* (CARLQUIST, 1970), sendo freqüentes na família Euphorbiaceae (MENNEGA, 2005).

As fibras gelatinosas são extensivamente encontradas nas dicotiledôneas arbóreas, desempenhando um papel importante não só contra o estresse causado pelo peso do próprio tronco como também no armazenamento de água nas paredes celulósicas (FISHER e STEVENSON, 1981; MERCANTI *et al.*, 2001). A presença de tais fibras em *Croton urucurana* foi atribuída a um mecanismo de resistência ao período de baixa disponibilidade hídrica, característico de espécies de habitat seco (LUCHI, 2004). A co-existência de fibras gelatinosas e fibras libriformes, não espessadas, indicam a presença de um lenho de tensão (CARLQUIST, 1970).

C. macrobothrys e *C. floribundus* possuem laticíferos distribuídos no parênquima cortical e na região floemática. A presença de laticíferos é observada em representantes de aproximadamente vinte famílias de Angiospermas, podendo estar regularmente distribuídos nos tecidos, entretanto, encontram-se mais freqüentemente associados ao floema e ao xilema (METCALFE and CHALK, 1967; THOMAS *et al.*, 1995). Laticíferos não articulados foram observados nos raios do xilema, e de forma mais abundante, nos raios do floema em Euphorbiaceae (FAHN, 1979).

O xilema é formado por elementos de vaso solitários e múltiplos. Os vasos solitários e múltiplos e o arranjo difuso dos vasos, observados em ambas as espécies estudadas são os tipos mais freqüentemente observados em espécies ocorrentes em florestas do tipo tropical (ALVES e ANGYALOSSY-ALFONSO, 2000). Em *C. floribundus* observou-se elementos de vaso com pontoações intervasculares alternas, o que também foi observado para a subfamília *Crotonoideae* (MENNEGA, 2005), *C. urucurana* (LUCHI, 2004) e *Hevea brasiliensis* (THOMAS *et al.*, 1995).

A distribuição e o acúmulo de metabólitos secundários são diversificados na família Euphorbiaceae (AMARAL, 1996 e RANDAU, 2004). O acúmulo de compostos fenólicos foi observado em ambas as espécies estudadas durante os diferentes estádios de desenvolvimento, sendo depositados nos tricomas, células epidérmicas e parenquimáticas das folhas e caules.

Em *C. macrobothrys*, as células do parênquima paliçádico constituem os principias sítios de acúmulo de fenólicos desde os estádios iniciais do desenvolvimento. Em *C. floribundus*, este acúmulo ocorre, principalmente, nas células do parênquima lacunoso. A especialização para o acúmulo destes compostos nas células do parênquima lacunoso foi relacionada ao seu papel na proteção passiva (BECKMAM *et al.*, 1972 ; KARABOURNIOTIS *et al.*, 1995).

Nos estádios primários de desenvolvimento do caule das espécies estudadas foram evidenciadas a presença de substâncias que apresentam coloração que varia de avermelhada à marrom nas células isoladas da casca, parênquima cortical e do parênquima axial do xilema,

indicando o acúmulo de taninos. Em *Hevea brasiliensis* também foram registrados a presença de substâncias fenólicas em células isoladas ou grupos de células do parênquima cortical, na casca e em células do raio e do parênquima axial, principalmente nas células adjacentes aos laticíferos (THOMAS *et al.*, 1995),

Os fenóis incluem uma grande diversidade de compostos, como os flavonóides, os taninos assim como os ácidos benzóicos e cinâmicos, sendo estes últimos capazes de complexar-se com proteínas, alcalóides e terpenos (SALATINO e GOTTLIEB, 1980; SIMÕES *et al.*, 2002). Os taninos são polifenóis encontrados sob a forma livre no citoplasma ou conjugados a polissacarídeos. Fenólicos capazes de se ligar às proteínas apresentam a função de proteção contra a herbivoria, uma vez que bloqueiam a ação de enzimas digestivas (HOWE e WESTLEY, 1990). Os taninos como grupo heterogêneo de substâncias derivadas do fenol, estão presentes em quase todos os tecidos vegetais, distribuídos no vacúolo, em formas de gotas, no citoplasma ou impregnando a parede celular (FAHN, 1979; ESAU, 1985). Os compostos fenólicos são armazenados em estado reduzido no interior do vacúolo e quando a planta é submetida a estresse biótico ou abiótico, estes compostos passam da forma reduzida atóxica e compartimentalizada para uma forma tóxica, não reduzida ocorrendo uma descompartimentalização (BECKMAM, 2000).

Compostos lipídicos foram encontrados na cutícula das folhas e caules jovens de ambas as espécies estudadas. Nas folhas, foram observados somente nas células crateriformes da epiderme e nos idioblastos imersos no parênquima esponjoso. No caule, estas substâncias foram observadas distribuindo-se aleatoriamente no parênquima cortical e no parênquima axial do xilema. No parênquima cortical de *C. floribundus* o número de idioblastos lipídicos é maior do que aqueles encontrados em *C. macrobothrys*. podendo representar um mecanismo adicional de defesa que *Croton floribundus* apresenta em relação a *Croton macrobothrys*.

O parênquima cortical do caule em crescimento primário de ambas as espécies analisadas apresenta grande concentração de terpenos. Além dessa região, o caule em crescimento secundário, apresenta depósitos de terpenos distribuídos nas células da periderme.

Os testes histoquímicos indicam que, tanto os idioblastos quanto os laticíferos de *C. macrobothrys* e *C. floribundus* apresentam em seu conteúdo, compostos de natureza química diversificada onde estão incluídos os lipídeos, terpenos e substâncias fenólicas. A formação mista de compostos também foi observada em *Croton lechleri*, cujo látex é constituído por uma mistura de metabólitos secundários, onde as proantocianidinas são os maiores constituintes e outros fenóis e seus derivados, assim como os alcalóides e terpenos encontram-se em menor concentração (PHILLIPSON, 1993).

Nas espécies de *Euphorbia*, o maior constituinte do látex são os terpenóides e seus ésteres estocados na forma de estruturas globulares (ADDAE-MENSAH, 1992; ALMEIDA, 2003), onde os terpenos podem representar cerca de 70 %-80 % de seu componente (PALOCCI, 2003). Menos freqüentemente, outras espécies da família Euphorbiaceae concentram em seu látex triglicérides, a exemplo de *Hevea brasiliensis* (SUBRAMANIAN, 1986).

Diferenças ultraestruturais foram observadas de acordo com a espécie e com os estádios de desenvolvimento estudados. A distribuição dos fenólicos, a estrutura dos plastídios e o arranjo dos peroxissomos e das mitocôndrias foram consideradas as características mais expressivas para a distinção dos dois *taxa*.

Nas folhas jovens e totalmente expandidas das espécies analisadas as células epidérmicas de ambas as faces da lamina foliar, apresentam vacúolos bem desenvolvidos com depósitos de substâncias eletrondensas, citoplasma denso, numerosos plastídios e presença de mitocôndrias. Em *C. floribundus* observa-se que o acúmulo de substâncias eletrondensas no vacúolo das células do parênquima lacunoso ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento. Com o crescimento foliar, este

acúmulo também ocorrerá no parênquima paliçádico, embora com menos frequência, ocupando totalmente o vacúolo.

Ultraestruturalmente, as células epidérmicas do caule e da folha, as células do mesofilo e do parênquima cortical do caule em ambas as espécies evidenciaram diferentes níveis e formas de acúmulo de depósitos eletrondensos considerados característicos de compostos fenólicos (SANTIAGO *et al.*, 2000). Em *Phyllanthus tenellus*, foram observadas células com vacúolo completamente impregnado de substâncias fenólicas, sendo estes de aparência granular ou não; células com baixos níveis destas substâncias e células sem tais substâncias.

Os cloroplastos presentes nas folhas e caule de ambas as espécies nos estádios iniciais do desenvolvimento, são pouco diferenciados, com tilacóides incipientes, grana com número de lamelas variável e grãos de amido e plastoglóbulos já diferenciados. Foi demonstrado que os plastos de células jovens de inúmeras espécies apresentam semelhanças entre si (MESQUITA *et al.*, 1989). O desenvolvimento dos cloroplastos de células do mesofilo ocorre através do crescimento do sistema de tilacóides, o qual é usualmente seguido de depósito de grãos de amido, formados no interior do sistema de lamelas, antes do seu completo desenvolvimento e ocorrendo, posteriormente, a formação de plastoglóbulos (KUTIK *et al.*, 1993).

Com o desenvolvimento, das folhas e caules, os plastos apresentam aumento no número e dimensões. Esse aumento é acompanhado pelo aumento dos grãos de amido e de plastoglóbulos que passam a ocupar um maior volume percentual nos cloroplastos já desenvolvidos. A formação de grãos de amido foi observada em cromoplastos do gênero *Croton*, contudo, a sua localização específica não foi identificada (MESQUITA *et al.*, 1990).

O aumento na quantidade de grãos de amido no estroma dos cloroplastos das células do mesofilo de *C. macrobothrys* e *C. floribundus* pode ser atribuída ao aumento na concentração de CO₂ em virtude do aumento da fixação do carbono (GRIFFIN *et al.*, 2001; WANG, *et al.*, 2004). Também

tem sido relacionado à influência de condições ambientais como a luminosidade, responsável por alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (KUNST, 1984), assim como a disponibilidade de nitrogênio, importante na diferenciação do cloroplasto, na formação dos tilacóides e na senescência dos grana (KUTIK *et al.*, 1993; YANO *et al.*, 2001). O aumento de volume dos grãos de amido foi atribuído ao déficit de nitrogênio seja pelo aumento da formação de sacarídeos durante a fotossíntese ou devido à impossibilidade dos sacarídeos formados durante a fotossíntese serem transformados em proteínas e compostos nitrogenados, assim como a incapacidade de transporte destes para outros órgãos (KUTIK *et al.*, 1993). A maior distribuição de grãos de amido também foi observada durante o aumento da incidência de UV-B (SANTOS *et al.*, 2004),.

Nos estádios iniciais de desenvolvimento, as folhas de ambas as espécies estudadas apresentaram baixa frequência ou ausência de plastoglóbulos nos plastos, embora estas gotas lipídicas aumentem em número e tamanho, nos estádios subseqüentes de maturação. As etapas de diferenciação observadas apresentam o mesmo padrão registrado para outras espécies (CARDINI *et al.*, 2005). O acúmulo de plastoglóbulos tem sido atribuído a senescência de cloroplastos, déficit de nutrientes e outras condições de estresse (GUNNING e STEER, 1975; SCHNEPF, 1980; DIXIT, 1988; DERUERE *et al.*, 1994). Os plastoglóbulos acumulam plastoquinona, a-tocoferol e outras substâncias lipídicas, formando depósitos lipídicos que podem ser exportados pelos cloroplastos (SELGA e SELGA, 1996). Estudos realizados em *Pinus sylvestris* relacionaram o número elevado de plastoglóbulos à exportação de substâncias lipídicas para a formação de resinas (SELGA e SELGA, 1996).

Observou-se que as mitocôndrias podem variar morfollogicamente de esféricas a filamentosas (DOUCE, 1985). Em *Croton macrobothrys* e *Croton floribundus* as mitocôndrias são morfollogicamente semelhantes, tendendo a forma circular e encerram grânulos eletrondensos com dimensões variáveis. As inclusões eletrondensas tem sido relacionadas com o armazenamento de

proteínas e grânulos osmiofílicos de fosfato insolúvel, provavelmente hidroxiapatita, comuns em células animais (DOUCE, 1985).

O número de mitocôndrias varia de acordo com o grau de diferenciação celular, morfologia e tipo celular nas plantas superiores (DOUCE, 1985). Uma baixa densidade de mitocôndrias é observada em todos os estádios do desenvolvimento e em todos os tecidos analisados das folhas e caules das espécies estudadas. Estas organelas estão distribuídas randomicamente através do citoplasma, de forma a favorecer todas as regiões celulares igualmente, podendo localizar-se próxima à membrana ou ao tonoplasto, de acordo com a necessidade energética (DOUCE, 1985). Em *C. macrobothrys* e *C. floribundus* as mitocôndrias apresentam-se aleatoriamente distribuídas ou próximas aos cloroplastos. A proximidade a organelas como cloroplastos e peroxissomos indicam a ação cooperativa entre enzimas e o fluxo de carbono para a fotorespiração (TOLBERT, 1971; DOUCE, 1985).

Os peroxissomos encontrados nas folhas e no caule de *Croton macrobothrys* apresentam forma predominantemente globular, a semelhança daqueles observados em *Arabidopsis thaliana* (MANO *et al.*, 2002). A presença de peroxissomos com estrutura em torus ou em uma morfologia tubular é comum na lâmina foliar (CUTLER *et al.*, 2000). O fenótipo do tipo torus tem sido atribuído à inclusão paracristalina amorfa que ocupa grande parte da matriz desta organela (HEINZE *et al.*, 1983). Em caules e folhas, os peroxissomos apresentam o mesmo padrão ultraestrutural, diferindo apenas no tamanho da estrutura paracristalina, independente do estágio de desenvolvimento (MANO *et al.*, 2002).

Demonstrou-se que a formação de inclusões paracristalinas nos peroxissomos é determinada pelo aumento e atividade de catalase, os quais podem ser ocasionados por fatores ambientais como o calor e o UV-B (DAT *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2004). Em plantas superiores, o metabolismo oxidativo ou estímulos ambientais formam espécies ativas de oxigênio (ROS) em peroxissomos

(YANIK, 2005). As enzimas catalase e peroxidase presentes nos peroxissomos são responsáveis pela detoxificação destes radicais livres, sendo consideradas como enzimas chave para a defesa antioxidante (SANTOS *et al.*, 2004 e YANIK, 2005).

7. CONCLUSÃO

No presente estudo sobre a anatomia e ultraestrutura de folha e caule de *Croton floribundus* e *C. macrobothrys* verificou-se:

- 1- Ambas as espécies apresentam estômatos do tipo paracítico
- 2- Folha anfiestomática na fase jovem
- 3- Folha hipoestomática na fase adulta de ambas as espécies
- 4- Folha com estrutura dorsiventral, contendo uma camada de parênquima paliçádico e 5-7 camadas de parênquima lacunoso
- 5- Idioblastos contendo cristais do tipo drusas de oxalato de cálcio são dispersos no parênquima paliçádico
- 6- Folha densamente pilosa nos estádios iniciais do desenvolvimento
- 7- Em *Croton macrobothrys* observa-se tricomas tectores dendríticos e estrelados
- 8- Em *Croton floribundus* observa-se tricomas tectores lepdote, acicular e tricomas glandulares
- 9- Em *Croton floribundus* esclereídes colunares conectam os tricomas da epiderme adaxial aos tricomas da epiderme abaxial
- 10- Em folhas de *Croton macrobothrys* as células do parênquima paliçádico são fontes de compostos fenólicos
- 11- Em folhas de *Croton floribundus* as células do parênquima lacunoso são fontes de compostos fenólicos
- 12- No xilema de *Croton floribundus* observa-se a presença de fibras gelatinosas

13- Em ambas as espécies observam-se a presença majoritária de terpenos na região cortical do caule

14- A periderme e parênquima cortical de ambas as espécies são sítios de acumulação de compostos fenólicos

15- A periderme de *Croton floribundus* é fonte de alcalóides

16- A secreção dos idioblastos e laticíferos de ambas as espécies estudadas é heterogênea, sendo composta principalmente de substâncias lipídicas, fenólicas e terpênicas.

16- Ultraestruturalmente, as espécies apresentam distribuição de organelas de forma semelhante sendo apenas a presença de peroxissomos restrito a *C. macrobothrys*.

17- O acúmulo dos compostos fenólicos no interior dos vacúolos ocorre de maneira semelhante no caule de ambas às espécies, sendo o principal sítio de acúmulo, o parênquima cortical do caule e parênquima paliçádico e lacunoso em folhas.

18- A anatomia do caule primário e secundário foi muito semelhante nas espécies analisadas. Porém, características como a presença de fibras gelatinosas no xilema e fibras de esclerênquima no parênquima medular e presença de cristais do tipo drusa de oxalato de cálcio no parênquima axial de *C. floribundus* mostraram-se diagnósticas no reconhecimento através de caracteres morfológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addae-Mensah, I.; Waibel, R.; Achenback, H.; Muriuki, G.; Pearce, C. & Sanders, J. K. M. 1989. A clerodane diterpene and their constituents of *Croton megalocarpus*. *Phytochemistry* 28(10): 2759-2761
- Addae-Mensah, I.; Achenback, H.; Thoithi, G., N.; Waibel, R. & Mwangi, J. W., 1992. Epoxychirodine and other constituents of *Croton megalocarpus*. *Phytochemistry* 31(6): 2055-2058
- Alexander, I. C.; Pascoe, K. O.; Manchard, P. & Williams, L. A. D. 1991. An insecticidal diterpene from *Croton linera*s. *Phytochemistry* 30(6): 1801-1803
- Almeida, A., B. A.; Melo, P. S.; Hiruma-Lima, C., A.; Gracioso, J., S.; Carli., L.; Nunes, D., S.; Haun, M. & Brito, A., R., S., 2003. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. *European Journal Pharmacology* 472: 205-212.
- Amaral A. C. F. 1996. *Contribuição à Química do Gênero Croton (Euphorbiaceae). Componentes de cinco Entidades*. Tese de Doutorado, NPPN, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 283p.
- Amaral A. C. F. & Barnes, R. A. 1998. A tetrahydropprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. *Phytochemistry* 47(7):1445-1447.
- Angyalossy-Alfonso, V. & Alves, E., S. 2000. Ecological trends in the wood anatomy of some Brazilian species. I: Growth rings and vessels. *IAWA Journal* 21:3-30.
- Arbo, M. M. 1972. Estructura y ontogenia de los nectarios foliares del género *Byttineria* (Sterculiaceae). *Darwiniana*. 17: 104- 158

- Bakker, M. E.; Gerritsen, A. F & Schaaf, P. J.Wander., 1992. Leaf anatomy of *Cinnamomum* Schaffer (Lauraceae), with special reference to oil and mucilage. *Blumea* 37: 1-30.
- Beckman, C.,H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (3): 101-110.
- Beckman, C., H.; Mueller, W.,C & McHardy, W., E, 1972. The localization of stored phenols in plant hairs. *Physiological Plant Pathology* 2 69-74.
- Behnke, D. H. 1984. Structure and Ultrastructure: General Terminology, Taxonomic Applications, and Aspects of Trichome -Bacteria Interaction in leaf tips of Dioscorea. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. Plenum Press, New York :1-21
- Benz, B. W. & Martin, C. E. 2005. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae) *Journal of Plant Physiology* 163: 648-656
- Benzing, D. H.; Henderson, K.; Kessel, B. & Sulak J., 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany* 63:1009–1014
- Berry, P. & Wiedenhoeft, A. C. 2004. *Micandra inindata* (Euphorbiaceae), a New Species with unusual wood Anatomy from Black-water River Banks in Southern Venezuela. *Systmatic Botany* 29(1): 125-133.
- Bittner. M.; Aqueveque, P.; Becerra, J.; Alarcón, J.; Hernández, V. & Silva, M., 2001.Estudio Químico de especies de la familia Euphorbiaceae. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46(4): 419-431
- Bowers, J.E., 1990. Natural rubber-producing plants for the United States. *Cooperative State Research Service and National Agricultural Library*. NAL, Beltsville, Maryland.

- Brako, L. & J. Zarucchi. 1993. *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden* 45, 1–1286.
- Bringe, K.; Schumacher, C.F.A.; Schmitz-Eiberger, M.; Steiner, U.; Oerke, E.-C. 2006. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry* 67: 161-170.
- Cai, Y.; Evans, F.J.; Roberts, M.F.; Phillipson, J.D.; Zenk, M. H. & Gleba, Y.Y. 1991. Polyphenolic compounds from from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 30(6): 2033-2040
- Cai, Y.; Chen, Z. P. & Phillipson, J. D. 1993. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 34(3): 755-760.
- Cain, A . J. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopy Science* 88: 383-392.
- Caldwell, M. M., Robberecht, R. & Flint, S. D. 1983. Internal filters: Prospects of UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum* 58: 445–450.
- Campos, A., D.; Ferreira, A., G.; Hampe, M., M., V.; Antunes, I., F.; Brancão, N.; Silveira, E., P.; Osório, V., A. & Augustin, E. 2004. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa agropecuária Brasileira*. 39(7):637-643.
- Cardini, F & Bonzi, L. M. 2005. Carotenoid composition and its chemotaxonomic significance in leaves of ten species of the genus *Ceratozamia* (Cycads) *Journal of Plant Physiology* 162:517—528

- Carlquist, S. 1970. Wood anatomy of Hawaiian, Macaronesian, and other species of Euphorbia. New research in Plant Anatomy- Linnean Society of London cells. *Blumea* 37: 1-30.
- Chen Z. P., Cai, Y. & Phillipson, J. D. 1994. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta medica* 60: 541-545.
- Chung, H., Y.; Yokozawa, T.; Soung, D., Y.; No, J., K.; Baek, B., S., 1998. Peroxynitrite-Scavenging Activity of Green Tea Tannin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(11), 4484 - 4486.
- Cornish, K., 2001. Review Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species *Phytochemistry* 57 (2001) 1123–1134
- Corsi, G. & Bottega, S. 1999. Glandular Hairs of *Salvia oëcinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany* 84: 657-664
- Costa, C. G.; Callado, C. H.; Coradin, V. T. R. & Guerreiro, S. M. C. *Xilema*. in Appazato-da-Gloria, B. & Carmello-Gueirreiro, S. M. 2003. *Anatomia Vegetal*, Viçosa: UFV 438p
- Crock, J.: Wildung, M. & Croteau, R. 1997. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24): 12833–12838.
- Croteau, R. & McGarvey, D. J., 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1015–1026.
- Cutler, D. F. & Gregory, M. 1970. *New research in plant anatomy*. Linnean Society of London by Academic Press.

- Dat , J. F.; Lopez-Delgado, H.; Foyer, C. H. & Scott, I. M. 1998. Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings. *Plant Physiology* 116: 1351–1357
- David R. & Carde J. P. 1964. Coloration diff rentielle des inclusions lipidiques et terp niques des pseudophylles du pin maritime au moyen du r actif nadi. *Comptes rendus de l'Academie des Sciences. Paris, Serie D* 258: 1338–1340.
- De Bruyne, T.; Pieters, L.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; Vander, B. D. & Vlietinck, A., J., 1999. Biological Evaluation of proanthocyanidin dimmers and related polyphenols. *Journal of Natural Products* 62:954-958.
- Deruere J.; R mer, S.; d'Harlingue, A.; Backhaus, R. A.; Kuntz, M. & Camara, B. 1994. Fibril assembly and carotenoid over-accumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell* 6, 119–133.
- Desmarchelier, C.; Witting, S. F.; Coussio, J. & Cicca, G., 1997. Effects of sangre de drago from *Croton lechleri* M uell.-Arg. On the production of active oxygen radicals. *Ethnopharmacol* 58:103-108
- Dewick, P. M. 2002 The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds *Natural Product Reports* 19:181–222
- Dixit, A. B. 1988. Effects of particulate pollutants on plants at ultrastructure and cellular levels. *Annals of Botany* 62: 643-651
- Dong, Y.L.; He, L.C.; Wang, H.H.; You, H.S. & Wu, J.F., 2005. Effect of taspine hydrochloride on skin wound healing in rats and its mechanism. *Journal of Chinese integrative medicine* 3(5):386-90.

- Duarte, M., R. & Debur, C. M. 2005. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia*, 76: 41-49.
- Dufresne, C. J.& Farnworth, E. R. 2001: "A review of latest research findings on health promotion properties of tea" . *J. Nutr. Biochem.* 12: 404-421
- Eames, A.J. & Macdaniels, L.H. 1925. *An introduction to plant anatomy*. New York, McGraw-Hill Book. 364 p. il.
- Ehleringer, J. 1984. Ecology and Ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. E. Rodriguez; P.L. Healey & I. Mehta (eds.). *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York, Plenum Press
- Eisenreich, W.; Rohdich, F. & Bacher, A. 2001. Desoxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6: 78–84
- El-Meekkawy, S., Meselhy R. M. Nakamura, N. Hattori, M. Kawahata, T. & otake, T. 2000. Anti-HIV-1 phorbol ester from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 53: 457-464.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd ed. New York: John Wiley. 550p.
- Evans, C.; Befort, K.; Tabbara, L.; Chavkin, C. & Kieffer, B. 1996. The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. *Molecular Pharmacology* 49(2): 216-223
- Facchini, P. J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plant: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 29-66.

- Farias, R. A.; Rao, V. S. N.; Viana, G. S. B.; Silveira, E. R., Maciel, M. A. M. & Pinto, A C. S. 1997. Hypoglycemic effect of trans dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* *Planta medica* 63(6): 558-560
- Farnsworth, N. R.; Blomster, R. N.; Messmer, W. M.; King, J. C.; Persinos, G. J. & Wilkes, J. D. 1969. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. *Journal of Natural Products* 32 1-28.
- Fisher, J. B. & Stevenson, J. W. 1981. Occurrence of reaction wood in branches of dicotyledons and its role in tree architecture. *Botanical Gazette* 142: 82-95.
- Franceschi, V. R. & Horner Jr., H. T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46: 361-427
- Freudenberg, K., 1960. Catechins and hydroxyflavandiols as components of tannins. *Experientia* 15(16):101-105.
- Furlan, C. M. 1998. *Efeito da poluição aérea de Cubatão sobre o conteúdo de nitrogênio, fibras ligninas e substâncias fenólicas foliares e atividade Herbivórica em Tibouchina pulchra Cogn.* Dissertação de mestrado Departamento de Ecologia Geral do Instituto de Biociências USP
- Ganter, P. & Jollés, G. 1969. *Histochimie Normal et Pathologic* vol. I, Vol. II. Ganthier-Villars (Ed.). Paris.
- Gardner P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B. & Duthie, G. G. 2000 The relative contribution of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry* 67: 471-474.

- Gidrol, S. X.; Chresting, H.; Tana, H. & Kushn, A. 1994. Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex, Hui-Lang Tana, and Anil Kushn *The Journal of Biological Chemistry* 269(12): 9278-9283
- Gravano, E.; Corrado, T.; Benniciã, A. & Gucci, R., 1998. The Ultrastructure of Glandular Trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) Leaves *Annals of Botany* 81: 327-335
- Griffin, K.; L.; Anderson, O. R.; Gastrich, M. D.; Lewis, J.; Guanghui, L.; Schuster, W.; Seemann, J. R.; Tissue, D. T.; Turnbull, M. H. & Whitehead, D. 2001. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Journal of Ecology* 27 (5):2473-2478
- Guerrero, M. F.; Carró, R.; Martín, M. L.; San Román, L. & Reguero, M. T. 2001. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract form *Croton schiedeianus* Schlecht in rats. *Journal of EthnoPharmacology* 75:33-36.
- Gunning & Steer, 1975. Ultrastructure and the biology of plant cells
BES Gunning, MW Steer - London: Edward Arnold
- Gutschick, V. P. 1999. Research reviews Biotic and Abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, 143: 3-18.
- Haberlandt, G. 1928. *Physiological plant anatomy*. Trad. Montagu Drummond. 4 ed. London, Macmillan & Co. Ltda. 324p
- Hall, J.; L.; Flowers, T. J. & Roberts, R. M. 1984. *Plant cell structure and metabolism*. Second Edition London and New York 327-402
- Hao Z., Charles D.J., Yu L. and Simon J.E. 1996. Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43: 735–739.

- Harms, U. & Sauter, J. J. 1992. Localization of a storage protein in the wood ray parenchyma cells of *Taxodium distichum* (L.) L. C. Rich. by immunogold labeling. *Trees* 6: 37–40.
- Hartman, J. R.; Rupe, J. C. & Siegel, M. R. 1982. Influence of environment and plant maturity on grey leaf spot of corn caused by *Cercospora zeae-maydis*. *Phytopathology* 72:1587-1591.
- Haslam, E., 1988. Plant polyphenols (syn. Vegetable tannins) and chemical defense- a reappraisal. *Journal of Chemical Ecology*: 1789-1793.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59: 205-215.
- Helbsing S.; Riederer, M. & Zott, G. 2000. Cuticles of vascular epiphytes: efficient barriers for water loss after stomatal closure? *Annals of Botany* 86: 765-769.
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473-503.
- Hiruma - Lima, C. A, Spadari Bratfisch, R. C.; Grassi-Kassisse, D. M. & Souza- Brito, A. R. M. 1998. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 65: 325-330
- Hiruma - Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Souza-Brito, A. R. M.; Rodríguez, J.A.; Haum, M. & Nunes, D.S., 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethno pharmacology* 69: 229-234.
- Hiruma - Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Bighetti, E. J. B.; Grassi-Kassisse, D. M.; Souza-Brito, A. R. M. & Nunes, D.S. 2002. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. On gastric ulcer healing and protective factors of gastric mucosa. *Phytomedicine* 9: 523-529.

- Holloway, P., J., 1982 *Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview* - In: D. F. Cutler, K. L. Alvin & C. E. Price (eds.). *The Plant Cuticle*. Academic Press, London.
- Hook, D. D., Brown, C. L. & Wetmore, R. H. 1972 Aeration in trees. *Botanical Gazette* 133: 443–454.
- Howe, H. F. & Wesley, L. C. 1990. *Ecological Relationships of Plants and Animals* Ed. Oxford University Press. 273 p. il.
- Hardin, G., and Wagner, G. (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Archives of biochemistry and biophysics* 237: 88-100.
- Jenks, M. A. & Ashworth, E. N. 1999. *Plant epicuticular waxes: function, production, and genetics*. In: Janick J (ed) Horticultural Reviews. 23.
- Jensen W. A. 1962. *Botanical histochemistry. Principles and practice*. San Francisco and London: W.A. Freeman and Company.
- Joly, A.B. 1976. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 3a. ed. Editora Nacional, São Paulo.
- John, P. 1993. In *Biosynthesis of the Major Crop Products* :114–126. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Jones, Kenneth, 2003. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) - A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9(6): 877-896.

- Jordão, A., M. 2000. Estrutura e composição das proantocianidinas da uva. Evolução ao longo da maturação. *Millenium on line* 19
- Juniper, B. E. & Jeffree, C. E. 1983. *Plant surfaces*. London: Edward Arnold. 93p.
- Kaminski, E. W.; Orsó, E.; Böttcher, A.; Liebisch, G.; Drobnik, A.; Diederich, W.; Langmann, T.; Rothe, G.; Lackner, K., J.; Schmitz, G.; Broccardo, C.; Chambenoit, O.; Luciani, M., F.; Chimini, G. & Spruss, T. 2000. Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and *Abc1*-deficient mice. *Nature Genetics* 24:192 - 196.
- Karabourniotis, G.; Papadopoulos, K.; Papamarkou, M. & Manetas, Y., 1992 Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leave hair *Physiologia Plantarum* 86:414-418.
- Karabourniotis, G. & Fasseas, C. 1996. The dense indumentum with is polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany* 74:347-351.
- Karban, R.; Baldwin, I. T.; Baxter, K. J.; Laue, G. & Felton, G., W., 1997. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* 125: 66 – 71.
- Kleff S.; Sander S.; Mielke G. & Eising R.. 1997. The predominant protein in peroxisomal cores of sunflower cotyledons is a catalase that differs in primary structure from the catalase in the peroxisomal matrix, *European Journal of Biochemistry* 245: 402–410.
- Kim, J. S.; Kim, Y. O.; Ryu, H. J.; Kwak, Y.; S.; Lee, J. Y. & Kang, H. 2003. Isolation of Stress-Related Genes of Rubber Particles and Latex in Fig Tree (*Ficus carica*) and their Expressions by Abiotic Stress or Plant Hormone Treatments. *Plant Cell Physiology* 44(4): 412–414.

- Kolb, D. & Muller, M. 2004. Light, Conventional and Environmental Scanning Electron Microscopy of the Trichomes of *Cucurbit pep* subs. *Pep vary satirical* and Histochemistry of Glandular Secretary Products. *Annals of Botany* 94: 515-526.
- Kent, L. & Wisher, M. 1984. Adaptation changes of plastids in the leaves of *Ligature oval folium* Hack. var. *aurum* at different light intensities. *Protoplasma* 122(1-2): 132 - 137
- Kutik, B. K.; Cinceroval, A. & Dvorak, M. 1993. Chloroplast ultrastructure development during ontogeny of the second leaf of wheat under nitrogen deficiency. *Photosynthetica*, 28(3): 447 – 453
- Legault, J.; Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F., 2006. Essential oil and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. From Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* 103(1): 99-102
- Li, Lei; Youfu Zhao, Bonnie C. McCaig, Byron A. Wingerd, Jihong Wang, Mark E. Whalon, Eran Pichersky, and Gregg A. Howe. 2004. The Tomato Homolog of coronatine-insensitive 1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *The Plant Cell* 16, 126–143
- Lichtenthaler H. K. , 1999. The 1-desoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:47–65
- Lison, L. 1960. *Histochemie et cytochemie animales. Principes et méthodes*. Vols. 1, 2. Paris: Gauthier-Villars.
- Louro, R. P. ; Santiago, L. J. M. ; Mentz, L. A. ; Nunes, E., 2003 . Quebra-pedra, *Phyllanthus niruri*.. *Farmacopéia Brasileira* 4ed. Parte II, Fasc. 5

- Lucena, M., F., A., 1996. Levantamento taxonômico da família Euphorbiaceae Juss. nos brejos de altitude de Pernambuco. Recife, 114p. Monografia-Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Luchi, A. E., 2004. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. *Revista Brasileira de Botânica* São Paulo 27 (2): 271-280.
- Luthra, R.; Dubey, V., S.; Bhalla, R., 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of biosciences*. 28 (5).
- Mace, M.E., 1963. Histochemical localization of phenols in health and diseased banana roots. *Physiologia Plantarum* 16:915-925.
- Machado, S., R.; Silva, E., M., J., . 1999. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 22(2): 117-124
- Maciel, M.A.M., Pinto, A C. Silva, Arruda, A. C., Pamplona , S. G.S.R., Vanderlinde, F. A., Lapa, A. J., Echevarria, A. Grynberg, N. F., Côlus, I.M.S., Farias R.A.F., Luna Costa, A. F. & Rao, V.S.N., 2000 Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara* *Journal of EthnoPharmacology* 70: 41-55.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A C. Silva, Brabo, S.N. & da Silva, M.N. 1998. Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 49: 823-828.
- Maffei M., Chialva, F., Sacco, T., 1989. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist* 111:707-716.

- Maraschin, M.; Verpoorte, R., 2003. Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais- *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*
- Margis, M.M.; Sandroni, M.; Lumerzhain, M., Oliveira, D.E. 1999. A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 25(147): 24-32
- Marston, A.; Hostettmann, K., 1985. Plant molluscicides. *Phytochemistry* 24: 639-652
- Mauseth, J. D., 1988 Plant anatomy. Menlo Park: Benjamin Cummings, 560p.
- McDonald S, Prenzler P.D, Antolovich M, Robards K., 2001. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73:73-84.
- Menezes, L., N.; Silva, D., C.; Pinna, G., F., A., M., 2003. Anatomia Vegetal :303-325 Editora UFV
- Mennega, A. M. W. 2005. Wood anatomy of the subfamily Euphorbioideae A comparison with subfamilies *Crotonoideae* and *Acalyphoideae* and the implications for the circumscription of the Euphorbiaceae *IAWA* 26 (1): 1-68.
- Mesquita, J. F.; Dias, J. D. S.; Dinis, A. M., 1989. Electron microscopic study of the plastids of variegated leaves of *Croton* species. 1 Ultrastructural and pigmental evolution of different types of plastids. *Cytobios* 60:33-45.
- Mesquita, J. F.; Dias, J. D. S., 1990. Electron study plastids of variegated leaves of *Croton* species. 1- Ultrastructural and cytochemical aspects of induced starch synthesis in chloroplasts *Cytobios* 64:121-128
- Metcalf, C., R., and Chalk, 1950. Anatomy of the Dicotyledons. 2 vol. Clarendon Press, Oxford.

- Mole, S. & Waterman, P. G. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publication, London
- Moragas, C. J., 2001 Estudo dos constituintes químicos das cascas de *Croton macrobothrys* Baillon. 2001. 181 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – UFRJ
- Müller, A., H.; Abreu, A., S.; Barbosa, P., S.; Guilhon, G., M., S., P., 2001. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA* 1 (2): 1-9
- Ohana, D.T.; Amaral, A. C. F.; Kuster, R. M.; Ferreira, J. L. P. Estudo anatômico das folhas e cascas do caule de *Croton matourensis* Aublet (EUPHORBIACEAE).; 54º Congresso nacional de botânica 3ª reunião amazônica de botânica
- Oliveira D. E.; Margis-Pinheiro, M.; Sandroni, M.; Lummerzheim, M., 1999. A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 147
- Ortiz, B., Louro, R. P., 2002. Structural analysis of the *Croton urucurana* Baill, Trichomes leaves. In: Microscopia e Microanálise do Mercosul, Curitiba. *Acta Microscopica*.
- Ortiz, B.; Louro, R. P. ; Santiago, L. J. M., 2003. Leaf ultrastructure of *Croton compressus* Lam. (Euphorbiaceae). In: XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Caxambú. Proceedings of the XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis. v 1.
- Palocci , C.; Soro, S.; Cernia, E.; Fiorillo, F.; Carmela, M., A.; Belsito, B., M.; Monache, G., D.; Pasqua, G., 2003. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia* látex *Plant Science* 165 (2003) 577- 582

- Paoli, A . A. S. , Freitas, I., 1999. Structure and ultrastructure of the extrafloral nectaries of *Croton urucurana*. *Boletim de Botânica da UFS* 18: 1-10.
- Paoli, A . A. S., Barbosa, J. M., 2003. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* Spreng e de *Croton urucurana* Baill. *Revista Brasileira de Sementes* 17:57-68
- Paredes, C., Quintanar, A., Acosta, S., Orozco, G., Pérez, C. P., Torre-Blanco, A., 2001. Histoquímica de la corteza de cinco Angiospermas de una selva baja de Oaxaca. *Madera y Bosques* 7(2):49-61
- Pax, F.; Hoffman, H., 1931. Die natürlichen pflanzenfamilien. 19C. Engler, A. & Prantl, K. eds. Leipzig, Engelmann.
- Pearsse, A. G. E. 1968. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 3^a Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh.
- Pelletier, G.; Bechtold, N., 1998. In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in molecular biology* 82:259-66.
- Perdue, G. P., Blomster, R. N., Blake, D. A. & Farmsworth, N. R. 1979. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61: 124-126.
- Phillipson, J. D.; Cai, Y.; Chen, Z. P., 1993. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 34(1): 265-268.
- Pickett, J A. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, 1991. Harborne J B, Tomas-Barberan F A , editors. Oxford: Clarendon: 297–313.

- Pieters, L.; de Bruyne, T.; Claeys, M.; et al., 1993. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. *Journal of Natural Products* 56: 899-906
- Pimenta, J.A.; Medri, M., E. Bianchini, E.; Muller, C., Okamoto, J.,M.; Francisconi, L., M., J.; Correa, G., T., 1996. Aspectos da morfoanatomia e fisiologia de *Jacaranda puberula* Cham. (Bignoniaceae) em condições de hipoxia. *Revista Brasileira de Botânica* 19:215-220.
- Porras-Reyes, B. H., Lewis, W. H., Roman, J., Simchowicz, L., and Mustoe, T. A., 1993. "Enhancement of Wound Healing by the Alkaloid Taspine Defining Mechanism of Action (43567)" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 203: 18-25
- Poulter, C., D.; Sacchettini, J., C.; Tarshis, L., C., Proteau, P.J.; Kellogg, B., A., 1997. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 :15018-15023.
- Press, M. C., 1999. The functional significance of leave structure: a search for generations-research reviews. *New Phytologist* 143:213-219
- Randau, K. P.; Florêncio, D. C.; Ferreira, C. P.; Xavier, H. S., 2004. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(2).
- Ray, D.T., 1993. Guayule: a source of natural rubber. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advances in New Crops*. John Wiley and Sons, 338–342.
- Reeve, R. M., 1951. Histochemical tests for polyphenol in plant tissues. *Stain Technology* 26:91-96

- Rhoades, D. F. 1979. Evolution of Plant Chemical Defense Against Herbivores. Chapter 1 in Rosenthal, G.A. and Janzen, D.H. (eds). *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, NY.
- Riederer, M.; Schreiber, L., 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52: 2023-2032.
- Risco, E.; Cañigeral, S.; Ghia, F.; Vila, R.; Iglesias, J.; Alvarez, E., 2003. Immunomodulatory Activity and Chemical Characterization of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. *Planta Medica* 69:785-794.
- Ristic, Z.; Jenks, M., 2002. Leaf cuticle and water loss in maize lines differing in dehydration avoidance. *Journal of Plant Physiology* 159. 645–651
- Rocha, J., F.; Neves, L., J., 2002. As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. *Revista Lecta Bragança Paulista* 20(2): 183-194.
- Rodrigues, R., F.; Oliveira, F.; Fonseca, A., M., 2000. Anatomia Foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). *Rodriguésia* 51(78/79): 113-132.
- Rodriguez, E.; Healey, L. & Mehta, I., 1984. Biology and chemistry of plant trichomes. Plenum, New York. p 113-133
- Rohmer M., 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* , 6:565–574
- Romero, L.; Ruiz, J., M.; Rivero, R., M.; Cantarero, I., L., 2003. Role of Ca in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.) *Plant Growth Regulation* 41: 173–177.

- Salatino, A.; Gottlieb, O., R., 1980. Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the Papilionoideae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 8(1): 133-147.
- Santiago, L. J., Louro, R. P., Oliveira, D. E., 2000. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Annals of Botany* 86:1023-1032.
- Santos, I.; Fidalgo, F.; Almeida, J., M.; Salema, R., 2004. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation *Plant Science* 167: 925–935.
- Sastry, M. S., 1966 Taraxerol from rubber leaves. *Current Science* 35 : 544-545
- Saux, C.; Lemoine, Y.; Marion-Poll, A.; Deng, M.; Morot-Gaudry, J., F., 1987. Consequence of Absence of Nitrate Reductase Activity on Photosynthesis in *Nicotiana plumbaginifolia* Plants *Plant Physiology* 84(1): 67–72.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30 (12) :3875-3883.
- Schmelzer, E., Jahnen, W., and Hahlbrock, K., 1988. *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 2989-2993.
- Schnepf, E.; Herth, W., 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* : 105(2): 129 – 133
- Schnittger, A., Hulskamp, M., 2002. Trichomes morphogenesis: a cell cycle perspective. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* 357: 823-826.

- Schultes, R. E. 1987. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. in *The Euphorbiales. Chemistry, Taxonomy and Economic Botany*. Academic Press.
- Scott, F., M. & Bystrom, B., G., 1970. Mucilaginous idioblasts in Okra, *Hibiscus esculentus* L. In: ROBSON, N.K.B.
- Selga, T.; Selga, M., 1996. Response of *Pinus sylvestris* L. needles to electromagnetic fields. Cytological and ultrastructural aspects. *The Science of the Total Environment* 180 : 65-73
- Shigo, A. L., 1984. Compartmentalization: A conceptual understanding how trees grow and defend themselves. – *Annual Review of Phytopathology* 22: 189–214.
- Simões, M., O., 2002. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 833 p.
- Singh N, Luthra R, Sangwan R S and Thakur R S 1989 Metabolism of monoterpenoids in aromatic plants; *Current Research on Medicinal and Aromatic Plants* 11: 174–197.
- Sitte, P., 1974. Plastiden –Metamorphose und Chromoplasten bei *Chrysosplenium*. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 243-265.
- Solereider, H., 1908. Systematic Anatomy of the Dicotyledons. 2 Vols. Clarendon Press, Oxford
- Soo, K., O.; Hunseung, K.; Dong, H., S.; Jaemo, Y.; Keng-See, C.; Hoong Y.; Yeang, B., W.; Heimo, B.; Kyung-Hwan, H., 1999. Isolation, Characterization, and Functional Analysis of a Novel cDNA Clone Encoding a Small Rubber Particle Protein from *Hevea brasiliensis*. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 1132–1138

- Souza-Brito, A. R. M.; Rodríguez, J.A.; Hiruma - Lima, C. A; Haum, M.; Nunes, D.S., 1998 Anti-ulcerogenic activity of dehydrocrotonin, a diterpene isolated from *Croton cajucara* Benth. *Plant Medica*. 6: 126-129
- Spurr, A. R.. 1969. Low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*. 26 :31-43.
- Stenglein, S., A.; Colares, M., N.; Novoa, M., Arambarri, A., M.; 2005. Taxonomy of the New World species of *Lotus* (Leguminosae: Loteae) *Australian Journal of Botany* 53(8) 797–812
- Subramanian, A., Hasma, H., 1986. Composition of lipids in latex of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 501, *Journal Natural Rubber Research* 30- 40
- Sugimura Y.; Yamazaki, J.; Kamimura, Y.; Okada, M., 1999. Changes in photosynthetic characteristics and photosystem stoichiometries in the lower leaves in rice seedlings. *Plant Science* 148 (2): 155-163.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. Fisiologia Vegetal. 3^a Edição. Porto Alegre: Artmed.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., Romani, A. 2000 Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation . *New Phytologist* 148 (1), 69-77.
- Theis, N. ; Lerda, M., 2003. Evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*. 16: 93-103
- Thomas, V.; Premakumari, D.; Reghu, C., P.; Panikkar, A., O., N.; Amma, S., 1995. Anatomical and Histochemical Aspects of Bark Regeneration in *Hevea brasiliensis*. *Annals of Botany* 75: 421-426

- Torssell, K. B. G. 1997. Natural Products Chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach. Second Edition. Swedish Pharmaceutical.
- Trelease, R. N., Huang, A. H. C., Moore, T., S., 1983. Plant peroxisomes. New York Academic Press
- Turner G. W.; Gershenzon, J.; Croteau R. B., 2000. Distribution of peltate glandular trichomes on development leaves of peppermint. *Plant Physiology* 124: 655-663
- Ubillas, R.; Jolad, S., D.; Bruening R., C., Kernan, M., R., King, S., R.; Sesin, D., F., Barrett, M.; Stoddart, C., A.; Flaster, T.; Kuo, J., Ayala, F.; Meza, E.; Castañel, M.; McMeekin, D.; Rozhon, E.; Tempesta, M., S.; Barnard, D.; Huffman, J.; Smee, D.; Sidwell, R.; Soike, K.; Brazier, A.; Safrin, S.; Orlando, R.; Kenny, P., T., M.; Berova, N.; Nakanishi, K., 1994. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (sangre de drago). *Phytomedicine* 1:77-106
- Vaisberg A. J, Milla M, Planas MC, Cordova JL, de Agusti ER, Ferreyra R, Mustiga MC, Carlin L, Hammond GB. 1989. Taspine is the cicatrizing principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica* 55(2):140-143.
- Van Bel, A. J. E. (1990): Xylem-phloem exchange via rays: The undervalued route of transport. *Journal of Experimental Biology*. 41: 631–64.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998 Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10):4113-4117.
- Vitale, A.; Denecke, J, 1999. The Endoplasmic Reticulum—Gateway of the Secretory Pathway. *Plant Cell* 11: 615-628

- Wagner, G. J., Wang, E., Shepherd, R. W., 2004 New approaches for studying Exploiting and Old Protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11
- Wang, X., Anderson, O. Roger, Griffin, K., L., 2004 Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany* 51: 21–31
- Wang, X.; Lan. M.; Han-Ping, W.; Yong-Quan, S.; Lu, J.; Ding, J.; Kai-Cun, W.; Jian-Ping, J.; Fan, D. M., 2002. Direct effect of *Croton* oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World Journal of Gastroenterology* 8 (1):103-107.
- Wang, X.; Zhang, Z. Y.; Shi, Y. Q.; Lan, M.; Han, Q. L.; Wu, H. P.; Jin, J. P.; Fan, D. M., 2000. Preliminary study on protein differential expression of small bowel in BALB/c mice induced by *Croton* oil. *Journal Of Chinese Medicine* 9: 103-106
- Webb, M., A., 1999. Cell-Mediated Crystallization of Calcium Oxalate in Plants. *The Plant Cell* 11, 751-761.
- Webster G., L., 1993. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42:793-823
- Wheeler, E.A. 1986. Vessels per square millimeter or vessel groups per square millimeter? *IAWA Bulletin* 7:73-74.
- Wheeler, E.A. & Baas, P. 1991. A survey of the fossil record for dicotyledonous wood and its significance for evolutionary and ecological wood anatomy. *IAWA Bulletin* 12:275-332.
- Williams, J. E., OMD, 2001. Review of antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Alternative Medicine Review* 6 (6): 567-579.

- Wilson SR, Neubert LA, Huffman JC. 1976. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from *Croton californicus*. *Journal of the American Chemical Society* 98: 3669-3674.
- Wititsuwannakul, D.; Wititsuwannakul, R.; Sritanyarat, W.; Pearce, G.; Siems, W., F.; Ryan, C., 2006 Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis* *Phytochemistry* xxx (2006)
- Wylie, R., B., 1952. The bundle sheath extension in leaves of dicotyledons. *American Journal of Botany* 39(9): 645-651.
- Yanik , T.; Donaldson, R., F., 2005. A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes *Archives of Biochemistry and Biophysics* 435 :243–252
- Yano, M.; Kojima, S.; Takahashi, Y.; Lin, H.; Sasaki, T. , 2001. Genetic Control of Flowering Time in Rice, a Short-Day Plant. *Plant Physiology* 127: 1425-1429
- Zhang, L. Tinkle, S. S., 2000. Chemical activation of innate and specific immunity in contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 115: 168-176.
- Zhang, H. X.; Ren, P.; Huang, X.; Li Yuan., 2000. Regulation of traditional Chinese medicine on gastrointestinal hormone and motility. *Journal Of Chinese Medicine* 8: 635-637
- Zhu, J. Z.; Yang, G. H.; Leng, E. F., Chen, D. F., 1999. Effects of the traditional Chinese medicine on gastrointestinal motility. *Journal Of Chinese Medicine* 7:689-690.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)