

CAPÍTULO 1

HISTOQUÍMICA FOLIAR DE *Dimorphandra mollis* Benth.

“Os sistemas vivos são organizados de tal modo que formam estruturas de múltiplos níveis, cada nível dividido em subsistemas, sendo cada um deles um “todo” em relação a suas partes, e uma “parte” relativamente a “todos” maiores. Assim as moléculas combinam-se formando organelas, as quais, por seu turno, combinam formando células...”

FRITJOF CAPRA

1. INTRODUÇÃO

A anatomia vegetal tem relevante destaque na Fitotecnia, afinal é o corpo do vegetal o seu principal recurso. As práticas agriculturáveis exigem atenção especial na relação entre vegetais com diversos manejos, pois, o corpo do vegetal está dinamicamente relacionado a essas práticas (SILVA, ALQUINI & CAVALLET, 2005).

Entre conhecimentos de anatomia vegetal e seu relacionamento com a Fitotecnia destacam-se a propagação vegetativa, nutrição mineral,

melhoramento genético, crescimento, fisiologia vegetal e outras características como, por exemplo, as condições do solo, da água, da luz, da temperatura e da influência exercida sobre as características estruturais do vegetal (SILVA, ALQUINI & CAVALLET, 2005).

1.1. Histoquímica vegetal

A técnica químico-histológica de identificação botânica de substâncias dos vegetais está baseada no uso de reagentes cito ou químicos-histológicos previamente estabelecidos.

Essa metodologia é ferramenta importante em ciências como Agronomia, Biologia, Farmácia, Química, Antropologia e Paleontologia. Auxilia na identificação da composição de estruturas vegetais (p.ex. parede celular, epiderme, tricomas, vacúolos); de compostos do metabolismo primário e secundário dos tecidos vegetais (p.ex. compostos fenólicos – ligninas, taninos, flavonóides, cumarinas; alcalóides, aminoácidos, açúcares, ceras e mucilagens); de materiais fossilizados (determinação da composição e idade dos fósseis); e ainda, pode auxiliar na determinação da composição botânica de misturas vegetais oriundas de misturas de pós-vegetais, de pastagem animal, de fardo comercial, de misturas farmacêuticas e subsidiar a Botânica Sistemática.

COSTA & PROENÇA DA CUNHA (2000) afirmam que além do valor na localização microquímica dos princípios farmacologicamente ativos, as técnicas de histoquímica contribuem, ainda, na identificação dos vegetais e em particular de seus pós quer pela própria natureza física, de suas características morfológicas e natureza de suas fraudes ou falsificações.

Do ponto de vista ecológico e econômico, a aplicação mais importante do reconhecimento de estruturas histoquímica nos vegetais (identificação dos caracteres botânicos) é propiciar seleção de áreas adequadas ao seu cultivo e manejo, coligando maior produção e qualidade, ao tipo de substrato/ área/ condições de cultivo; e facilitando, conseqüentemente, a investigação fitoquímica de determinada espécie fornecendo subsídio ao manejo e comercialização dos seus subprodutos ou produtos agro-farmacêuticos.

Os métodos histoquímicos baseiam-se em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e do conteúdo celular (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000). São métodos de análise qualitativa e quantitativa de todos os componentes celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e elementos iônicos que ocorrem no meio celular (GERSBACH *et al*, 2001).

Esses métodos combinam várias técnicas de microscopia, fotomicroscopia apoiados em metodologia especial que valoriza a presença bem como o sítio ativo das substâncias químicas ou grupos de compostos do metabolismo secundário nas plantas.

Testes histoquímicos básicos revelam a natureza de tais substâncias no que concerne o caráter lipofílico (principalmente) e ou hidrofílico (COSTA, 1996). Os testes são organizados por grupos de compostos biológicos caracterizados pelo conteúdo e ainda nas propriedades químicas e farmacológicas (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Segundo PEARSE (1960) em histoquímica vegetal distinguem-se substâncias de caráter lipofílico e hidrofílico. Como lipofílico têm-se os lípidios totais; lípidios insaturados; ácidos graxos; terpenóides (óleos, resinas,

esteróides, lactonas sesquiterpênicas); terpenóides com grupo carbonila; borracha ou látex e como substâncias de caráter hidrofílico os compostos fenólicos (flavonóides, taninos), ligninas, alcalóides, polissacarídeos, mucopolissacarídeos ácidos, amido, glucanos, pectinas, mucilagens, calose, proteínas.

Os corpos gordos ou substâncias de caráter lipofílico acumulam-se nos vegetais em particular nas sementes, encontram-se, ainda, em quantidades significativas nos esclerócitos, disseminados no citoplasma na forma de gotículas refringentes e em glóbulos grandes, em tricomas ou em estruturas secretoras específicas (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Caracterizam-se como substâncias lipofílicas, os óleos essenciais (fixos e voláteis), esteróides, vitaminas, tocoferol, ceras e gorduras. Particularmente em histoquímica vegetal distinguem-se como substâncias de caráter lipofílico os lípidios totais; lípidios insaturados; ácidos gordos; terpenóides (óleos, resinas, esteróides, lactonas sesquiterpênicas); terpenóides com grupo carbonilo; borracha (ASCENSÃO, 2003; PEARSE, 1960).

Os óleos essenciais fixos ou voláteis podem ser encontrados nas células epidérmicas e parenquimatosas; estruturas secretoras e principalmente em tricomas (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000). Trabalhos como de GERSBACH *et al* (2001); ASCENSÃO & PAIS (1998); LEWINSOHN *et al* (1998); ROCHA *et al* (2002); MONTEIRO *et al* (2001) destacam a importância da histoquímica como ferramenta na identificação e caracterização de compostos fenólicos.

Resultados de estudos morfológicos, estruturais, ultra-estruturais, histoquímicos e bioquímicos envolvendo tricomas glandulares podem ser encontrados em MONTEIRO *et al* (2001), CARLQUIST (1958; 1959A); SCHNEPF

(1969); VERMEER & PETERSON (1979); KARRFALT & KREITNER (1980); KELSEY & SHAFIZADEH (1980); WERKER & FAHN (1981; 1982); ASCENSÃO & PAIS (1982); ASCENSÃO & PAIS (1985); CAPPELLETTI *et al* (1986); ASCENSÃO & PAIS (1987); DUKE & PAUL (1993); DUKE *et al* (1994); WERKER *et al* (1994); AFOLAYAN & MEYER (1995); CORSI & NENCIONI (1995); FERREIRA & JANICK (1995); servindo como padrões de referência e destacando tais estruturas como potenciais sítios de reserva de terpenos.

A cutícula localiza-se na epiderme como camada não celular de substâncias lipídicas, segregada pelas células da epiderme e possui propriedades impermeabilizantes (BRUNETON, 1995; FAHN, 1992).

Os glucídios em histoquímica são identificados como polissacarídeos em geral, amido, celulose e calose, pectinas, mucilagens, mucopolissacarídeos ácidos (ASCENSÃO, 2003).

O amido (homoglicano) é acumulado em plantas sendo a principal fonte de reserva, nos tecidos parenquimatosos. Celulose é o composto orgânico mais abundante na terra, constituindo paredes celulares da célula vegetal. Localiza-se, também, nas fibras, nos tecidos esclerenquimatosos. Inulina é polímero linear de frutose, molécula de reserva em órgãos subterrâneos de plantas das famílias Asteraceae, Liliaceae e em algumas Gramineae (Poaceae) (CARVALHO & RIBEIRO, 2006; TEIXEIRA, 2006; 1997).

As mucilagens localizam-se nos tecidos parenquimatosos, em células isoladas ou em grupos nas raízes, caules, folhas e nas sementes na epiderme do tegumento, por células mucilaginosas e estratificada (TEIXEIRA, 2006).

Por compostos fenólicos subentendem-se em histoquímica os fenóis simples, os orto-di-hidroxifenóis, os flavonóides e agliconas flavônicas; taninos e ligninas (lenhinas) (ASCENSÃO, 2003).

A suberina e lenhina dispõem-se na parede celular e nas estrias de Caspary na endoderme, permitindo a passagem de substâncias ergástricas (BRUNETON, 1995; FAHN, 1992).

Os taninos são compostos fenólicos, que se distribuem por toda planta, localizam-se nas células vivas, solubilizados no suco dos vacúolos na forma de combinações complexas, e contribuem na formação das paredes celulares do súber e lenho. Podem também estar em idioblastos. Em plantas com alta concentração de tanino (como p. ex. Barbatimão – *Stryphnodendron adstringens* ou *Dimorphandra mollis*), esses podem ser encontrados em todas as regiões e tecidos, particularmente do córtex, floema e raios medulares (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Os heterosídeos flavônicos (flavonóides) encontram-se localizados nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, no tecido parenquimático, no suco celular, em cristais ou precipitados nas células (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Alcalóides podem ser localizados sob a forma de sais orgânicos, nos tecidos externos de raízes e caules, nas epidermes, tricomas, no mesofilo das folhas, no tegumento das sementes (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000), nos anais secretores e glândulas translúcidas como relatado por CICCARELLI *et al* (2001) e CORSI *et al* (1998).

O ácido cianídrico resultante da hidrólise dos heterosídeos cianogenéticos localiza-se em tecidos vivos e em paredes dos vasos, os

heterosídeos senevólicos localizam-se em células isolados de precipitado negro. As antraquinonas e heterosídeos antraquinônicos são observados em células do lenho e súber, ainda em algumas do mesofilo, incluindo do parênquima paliádico e ainda dispostos em cristais (*Rheum* sp - Ruibarbo) (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Os heterosídeos antociânicos (antocianinas – pigmentos) encontram-se dissolvidos nas células, no suco vacuolar. As proteínas estão amplamente distribuídas nas membranas celulares e demais tecidos e caracterizam-se histoquimicamente em proteínas totais (ASCENSÃO, 2003).

As saponinas (triterpenos) encontram-se em particular nos tecidos parenquimatosos do córtex, floema, medula e em algumas espécies podem estar dispersos em determinados tecidos (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

As metil-xantinas podem estar dispostas nos tecidos parenquimáticos na forma de cristais em agulhas, ou aciculares, drusas ou pequenas partículas. Os pigmentos naturais (clorofílicos e carotenóides) estão dispersos no suco celular (flavonóides e antraquinonas), e se, extracelulares nos sistemas secretores, xilema secundário e revestimentos suberificados (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Em frutos e folhas de *Dimorphandra mollis* (fava d'anta, falso barbatimão, faveiro, favela) quimicamente, foram identificados os compostos fenólicos flavonóides (rutina e quercetina) e taninos (MACEDO *et al*, 2002; MENDES *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2002; LORENZI & MATOS, 2002). Não foram encontrados na bibliografia consultada estudos de caracterização histoquímica de folhas de *D. mollis* ou de *D. gardneriana*. A importância da caracterização histoquímica desses compostos nas espécies está nos futuros trabalhos de

caracterização fitoquímica e morfo-anatômicos com porções do vegetal de maiores teores de princípios ativos.

2. OBJETIVOS

- Esclarecer que estruturas anatômicas funcionam como sítios de armazenamento e produção dos compostos secundários flavonóides e taninos (compostos fenólicos) em folhas de *Dimorphandra mollis* e *D. gardneriana*.
- Identificar outros possíveis compostos que estejam presentes em *D. mollis* e *D. gardneriana*.
- Relacionar os resultados da análise histoquímica vegetal com testes de triagem fitoquímica em *D. mollis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Plantas matrizes de *D. mollis* e *D. gardneriana* cultivadas em Montes Claros (Minas Gerais) foram transportadas até Viçosa, onde foram plantadas em vasos de 10 L com substrato constituído de 2/3 de solo proveniente da região do “Tiro de guerra”, Viçosa (anexo 1) e 1/3 de areia em casa de vegetação telada nas dependências do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Preparo das amostras

Após 60 dias de instalação do experimento em casa de vegetação telada, coletou-se o último folíolo da porção mediana de folhas adultas totalmente expandidas de *D. mollis*, constituindo o tratamento TR-DM e de *D. gardneriana*, o TR-DG, que foram submetidos à caracterização histoquímica.

3.3. Obtenção dos cortes histológicos

Os cortes histológicos dos tratamentos (TR-DM e TR-DG) selecionados foram feitos a partir de micrótomo LPJ, de mesa, modelo Rolemberg & Bhering, em pecíolo de embaúba, selecionados com auxílio de um pincel nº 2, marca

Tigre e/ ou pinça metálica e colocados em placas de vidro (Petri, Ø 5cm) com os reagentes prévios de caracterização histoquímica.

3.4. Análise Histoquímica de folhas de *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tull.

A metodologia de análises histoquímicas foi feita de acordo com ASCENSÃO (2003) (esquema I – A, B, C, D), e que enfatiza a presença e infere sobre os sítios armazenamento e/ ou síntese das substâncias químicas ou grupos de compostos do metabolismo secundário nas plantas.

Desta forma preparou-se reagentes específicos à identificação de lipídios (lipídios ácidos e neutros, insaturados ácidos gordos), terpenóides (óleos essenciais e oleoresinas, esteróides, borracha); compostos fenólicos (fenólicos gerais, taninos e ligninas); alcalóides, glucídios (polissacarídeos gerais, amido, calose, pectinas, mucopolissacarídeos ácidos, mucilagens); proteínas (proteínas totais), bem como os necessários à elaboração dos controles.

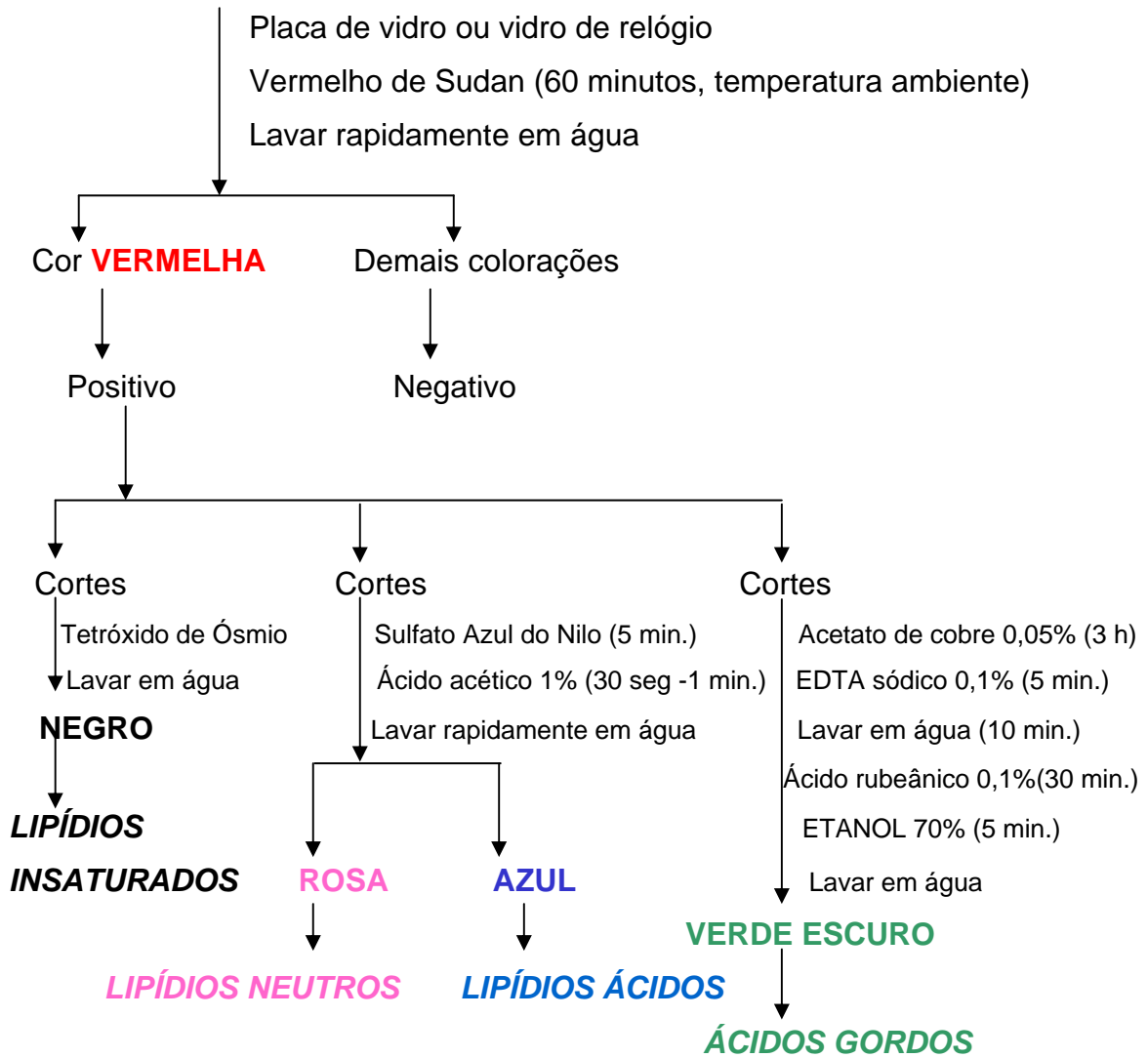
Foram usados Vermelho de Sudan B (PEARSE, 1980) – Lípidios totais (esquema 1.A), Sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) – Lípidios ácidos e neutros (esquema 1.A); Tetróxido de ósmio (GANTER & JOLLÉS, 1969; 1970) – Lípidios insaturados (esquema 1.A); Acetato de cobre/ ácido rubeânico (GANTER & JOLLÉS, 1969) – Ácidos graxos (esquema 1.A); Reagente de NADI (DAVID & CARDE, 1964) – Óleos essenciais e Oleoresinas (esquema 1.B.I); Tricloreto de antimônio (HARDMAN & SOFOWORA, 1972; MACE *et al.*, 1974) – Esteróides (esquema 1.B.II); Ácido sulfúrico (GEISSMAN & GRIFFIN, 1971) – Lactonas sesquiterpênicas (esquema 1.B.III); 2,4-Dinitrofenilhidrazina (GANTER & JOLLÉS,

1969) – Terpenóides com grupos carbonila (esquema 1.B.IV); Cloreto férrico, Dicromato de potássio (GABE, 1968) – Compostos fenólicos (esquema 1.C.I), Vanilina clorídrica (MACE & HOWELL, 1974) – Taninos (esquema 1.C.III); Cloreto de Alumínio (CHARRIÈRE-LADREIX, 1976) – Flavonóides (esquema 1.C.II); Floroglucinol (JOHANSEN, 1940) – Ligninas (esquema 1.C.IV); Reagente de Dragendorff (Yoder & Mahlberg, 1976), Reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG, 1981) – Alcalóides (esquema 1.D); Reagente de Schiff/ Ácido periódico (PEARSE, 1980) – Polissacarídeos gerais (esquema 1.E.I); Lugol (JENSEN, 1962) – Amido (esquema 1.E.II); Azul de anilina – Calose (esquema 1.E.IV); Vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940) – Pectinas (esquema 1.E.V); Azul de Alcian (STEEDMAN, 1950; BANCROFT & COOK, 1994) – Mucopolissacarídeos (esquema 1.E.IV); Ácido tânico/ Cloreto férrico (PIZZOLATO & LILLIE, 1973) – Mucilagens (esquema 1.E.VII); Azul brilhante de Comassie (GAHAN, 1984) – Proteínas (esquema 1.F).

Esquema 1: Histoquímica vegetal (Ascensão, 2003)

A. Detecção de lipídios

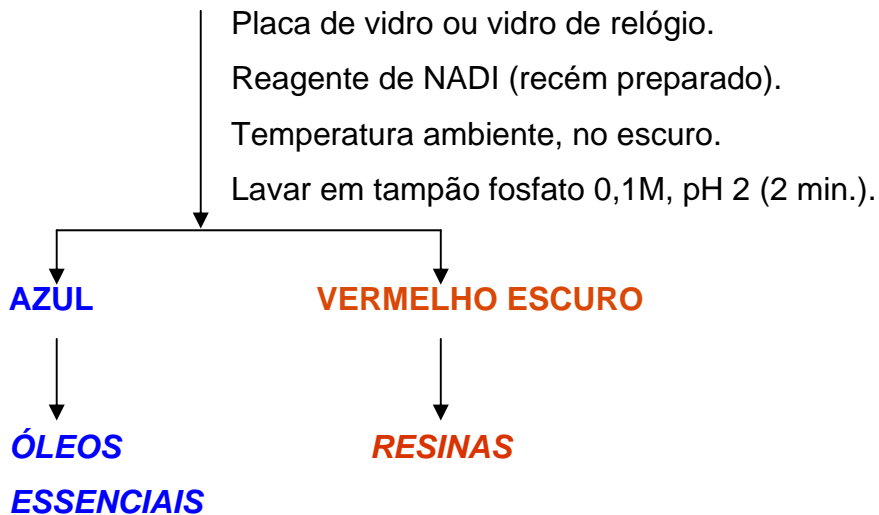
Cortes histológicos (material fresco)



B. Detecção de Terpenóides (I, II, III, IV e V)

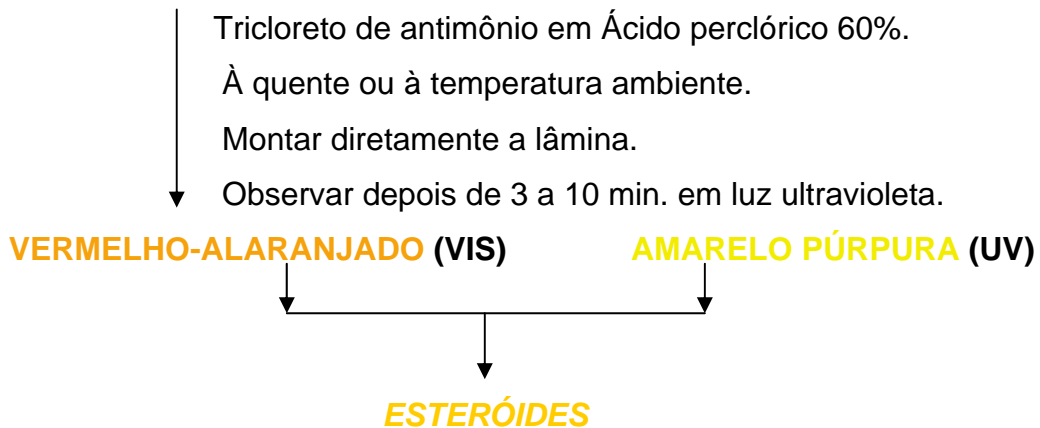
I. Óleos essenciais e Resinas

Cortes histológicos (material fresco)



II. Esteróides

Cortes histológicos (material fresco)



III. Lactonas sesquiterpênicas

Cortes histológicos (material fresco)

↓
Ácido sulfúrico P.A.

Montar a lâminas e observar imediatamente.

↓
VERMELHO ACASTANHADO

↓
LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

IV. Terpenóides com grupo carbonila

Cortes histológicos (material fresco)

↓
2,4-Dinitrofenilhidrazina em HCl 2N.

Temperatura ambiente, 10 mim).

↓
Lavar em água.

↓
VERMELHO ALARANJADO

↓
TERPENÓIDES E CETOESTERÓIDES

V. Borracha

Cortes histológicos (material fresco)

↓
Oil Red O em ácido fórmico 90% (3 – 5 mim).

Lavar em água.

Montagem em glicerina (VIS) ou glicerina 50% (UV).

↓
VERMELHO

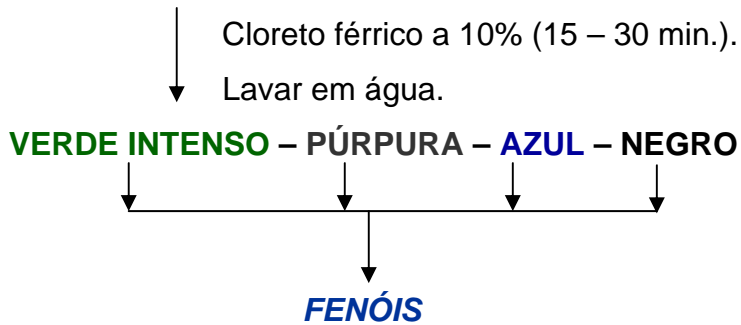
↓
VERMELHO PÁLIDO (UV)

↓
BORRACHA

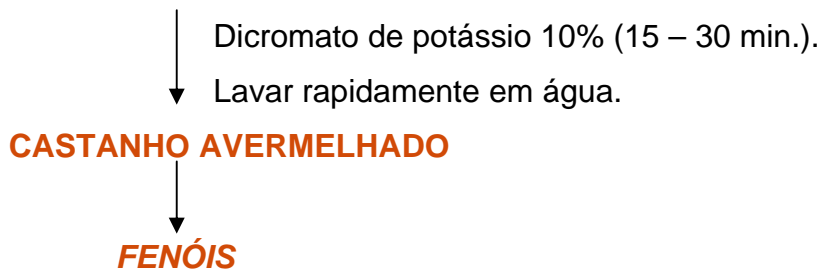
C. Detecção de Compostos fenólicos (I, II, III e IV)

I. Fenóis

- Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

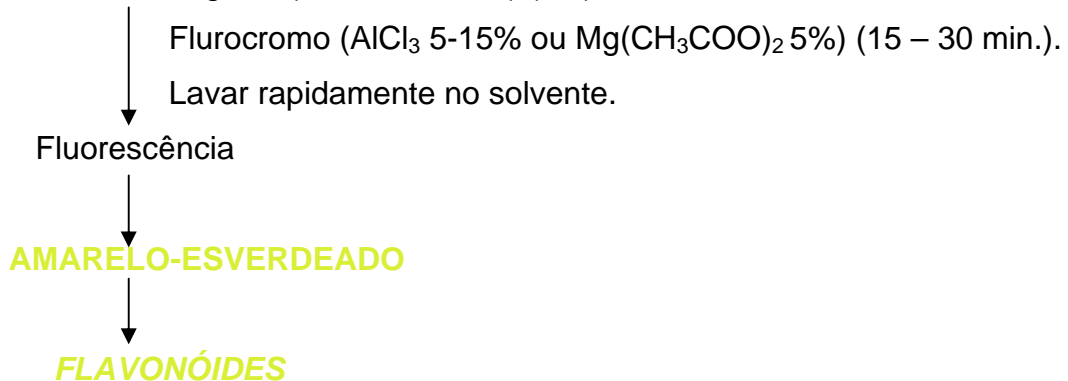


- Cortes histológicos (material fresco) (VIS)



II. Flavonóides

Cortes histológicos (material fresco) (UV)



III. Taninos

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓
Vanilina 5% em HCl a 9% (10 min.).

↓
Montagem em Ácido Clorídrico (HCl) 9%.

VERMELHO A RÓSEO

↓
TANINOS

IV. Ligninas (Lenhinas)

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓
Floroglucinol em HCl a 20% (1 – 2 min.).

↓
Montar diretamente a lâmina.

VERMELHO

↓
LIGNINAS

D. Detecção de Alcalóides

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓
Reagente de Dragendorff (5 – 10 min.).

↓
Lavagem em Nitrito de sódio a 5%.

↓
Lavagem em água.

CASTANHO AVERMELHADO

↓
ALCALÓIDES

E. Detecção de Glucídios (I, II, III, IV, V, VI e VII)

I. Polissacarídeos gerais

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓ Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% (recém preparado, 30 min.).

↓ Ácido perclórico 1% (10 min.).

↓ Lavagem rápida em água.

↓ Reagente de Schiff (15 min.).

↓ Lavagem em metabissulfito de sódio (3 vezes, 2 min.).

↓ Lavagem em água.

ROSA



AMIDO E POLISSACÁRIDEOS

II. Amido

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓ Reagente Lugol (sol. Iodo 0,5%, Iodeto de Potássio 1% (5 – 10 min.).

↓ Lavagem em água.

ROXO



AMIDO

III. β -1,3 e β -1,4 Glucanos

Cortes histológicos (material fresco) (UV)

↓ Calcofluor White MR2 0,01% (5 – 10 min.).

↓ Lavagem rápida em água.

AZUL PÁLIDO

↓
**CELULOSE, POLISSACARÍDEOS CARBOXILADOS, β -1,3 E β -1,4
GLUCANOS, PECTINAS, POLISSACARÍDEOS DE MUCILAGENS**

IV. Calose

Cortes histológicos (material fresco) (luz Azul)

↓ Azul de Anilina 0,05% (5 min.).

↓ Lavagem em água.

FLUORESCÊNCIA AMARELA PÁLIDO

↓
CALOSE

V. Pectinas

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

↓ Vermelho de rutênio a 1000 ppm (10 min.).

↓ Lavagem rápida em água.

ROSA

↓
PECTINAS

VI. Mucopolissacarídeos Ácidos

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

- ↓ Azul de Alcian a 1% em Ácido acético 3% (pH = 2,5; 30 min.).
- ↓ Lavagem em água (5 min.).

AZUL TURQUESA



MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

VII. Mucilagens

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

- ↓ Ácido tânico 5% (10 min.).
- ↓ Lavagem em água.
- ↓ Cloreto férrico 3% (1min.).
- ↓ Lavar rapidamente em água.

NEGRO



MUCILAGENS

F. Detecção de proteínas

Cortes histológicos (material fresco) (VIS)

- ↓ Azul brilhante de Comassie (C. Blue) 0,25% em Ácido acético 7%.
- ↓ Temperatura ambiente (10min.).
- ↓ Lavar rapidamente em água.

AZUL



PROTEÍNAS

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Histoquímica foliar de *Dimorphandra mollis* Benth.

Os resultados das análises histoquímicas nos tratamentos TR-DM e TR-DG estão no quadro 1 e nas figuras 1 a 7.

A caracterização de lipídios por sudan IV nos tratamentos TR-DM e TR-DG foi positiva, conforme pode ser visualizado no quadro 1 e nas figuras 1A a 1D. Os lipídios distribuem-se por todas as células epidérmicas (adaxial e abaxial), nas papilas e em gotículas dispersas nas células epidérmicas e parenquimatosas.

Os lipídios ácidos e neutros detectados por sulfato azul do Nilo nos tratamentos TR-DM e TR-DG também foram positivos (quadro 1), resultando em gotículas roxas nas células epidérmicas (dados não mostrados).

Óleos essenciais e resinas detectados pelo reagente de NADI foram positivas nos tratamentos TR-DM e TR-DG (quadro 1) (figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G). Em *D. mollis* sob fluorescência pode-se visualizar resinas em células epidérmicas, xilemáticas e floemáticas.

As reações de identificação de compostos fenólicos foram positivas nos tratamentos TR-DM e TR-DG, por cloreto férrico e por dicromato de potássio

(quadro 1), no entanto pelo excesso de compostos fenólicos, a diferenciação de estruturas vegetais fica dificultada, pois estão dispersos nas células da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico, nervura mediana e feixes vasculares, principalmente nas paredes celulares dos vasos lenhosos (xilema e floema) (figura 3A e 3B), e ainda, podem ser visualizados drusas e idioblastos (inclusões) contendo compostos fenólicos distribuídos no parênquima lacunar.

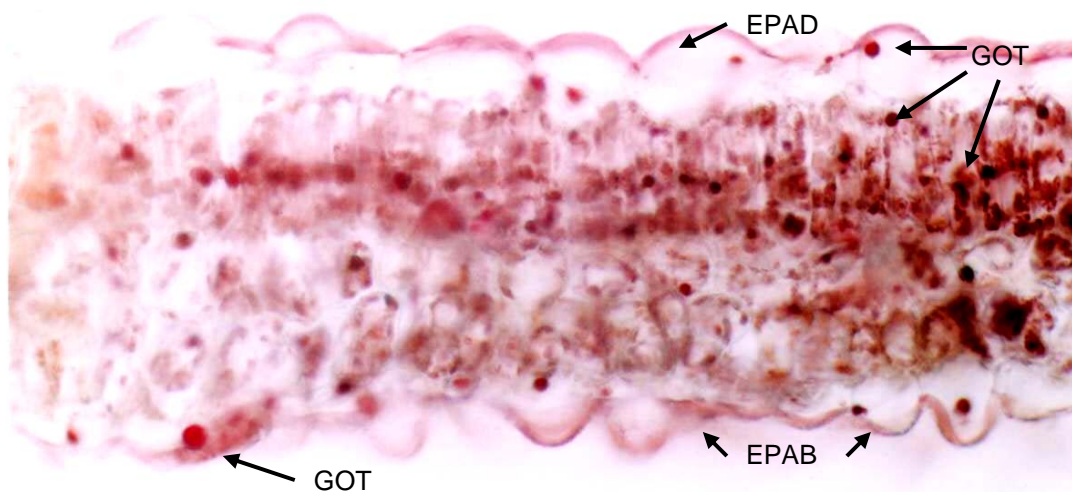
A presença de taninos foi detectada por vanilina clorídrica, bem como de flavonóides por cloreto de alumínio em ambos os tratamentos. Foram visualizados também inclusões citoplasmáticas dispersas no tecido parenquimatoso (dados não mostrados em TR-DM) (figura 4A), (quadro 1).

Ligninas em presença de floroglucinol colorem de vermelho a róseo-vermelho os vasos lenhosos da nervura mediana em TR-DM e de TR-DG (figuras 5A, 5B, 5C), (quadro 1).

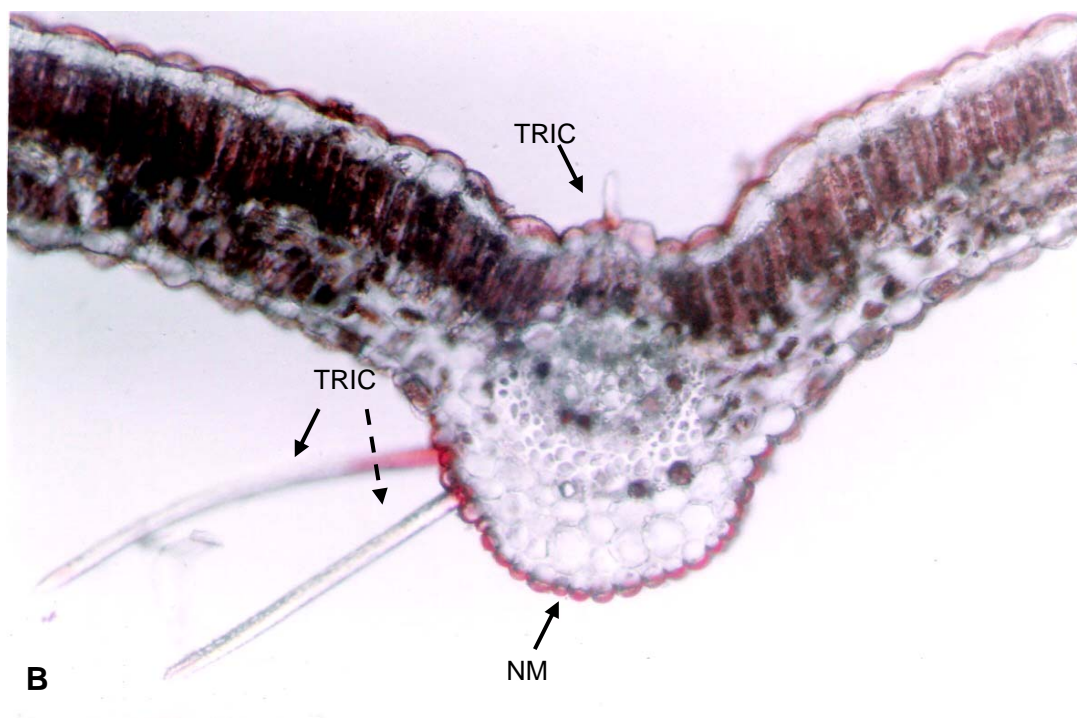
Com vermelho de rutênio pectinas foram detectadas na bainha dos feixes vasculares, nas paredes das células do colênquima angular e epidérmicas em TR-DM (figuras 6A, 6B, 6C), e em TR-DG apenas nas células da bainha do feixe vascular (figura 7) (quadro 1).

Os testes de alcalóides e amido foram negativos em folhas. Nas demais reações não foram detectados polissacarídeos gerais, polissacarídeos ácidos, mucopolissacarídeos e proteínas nas folhas dos tratamentos TR-DM e TR-DG (quadro 1).

Figura 1: Reação de detecção de lipídios em *D. mollis* (TR-DM 1A e 1B) e *D.gardneriana* (TR-DG 1C e 1D) (Sudan IV).

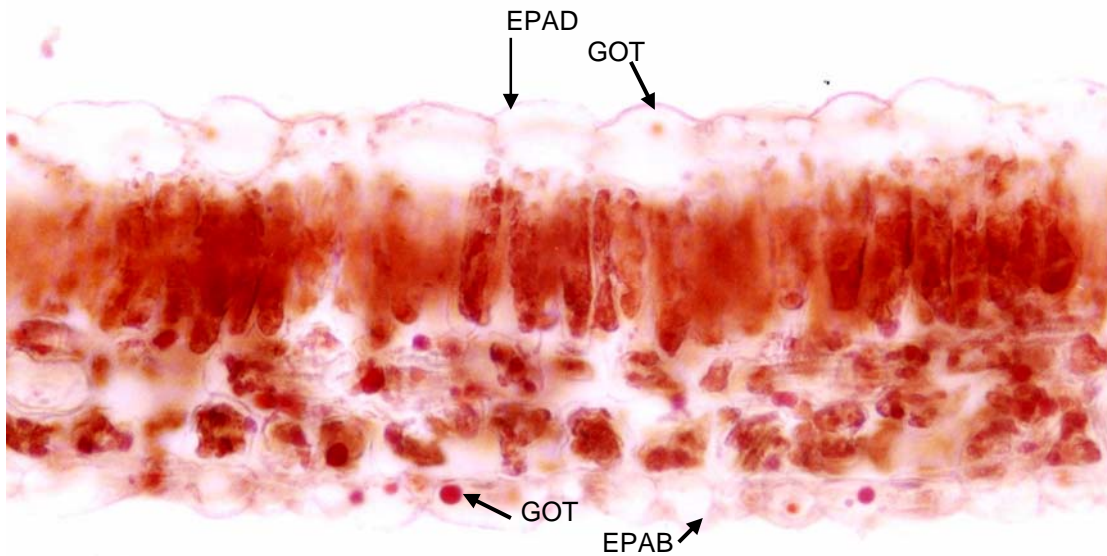


A



B

1.A: *D. mollis* (Sudan): detalhe das papilas e gotículas de lipídios (GOT) nas células da epiderme adaxial e abaxial (EPAD E EPAB), e nos tecidos parenquimáticos. **B.** Nervura mediana (NM) de *D. mollis*, detalhe dos tricomas (TRIC).

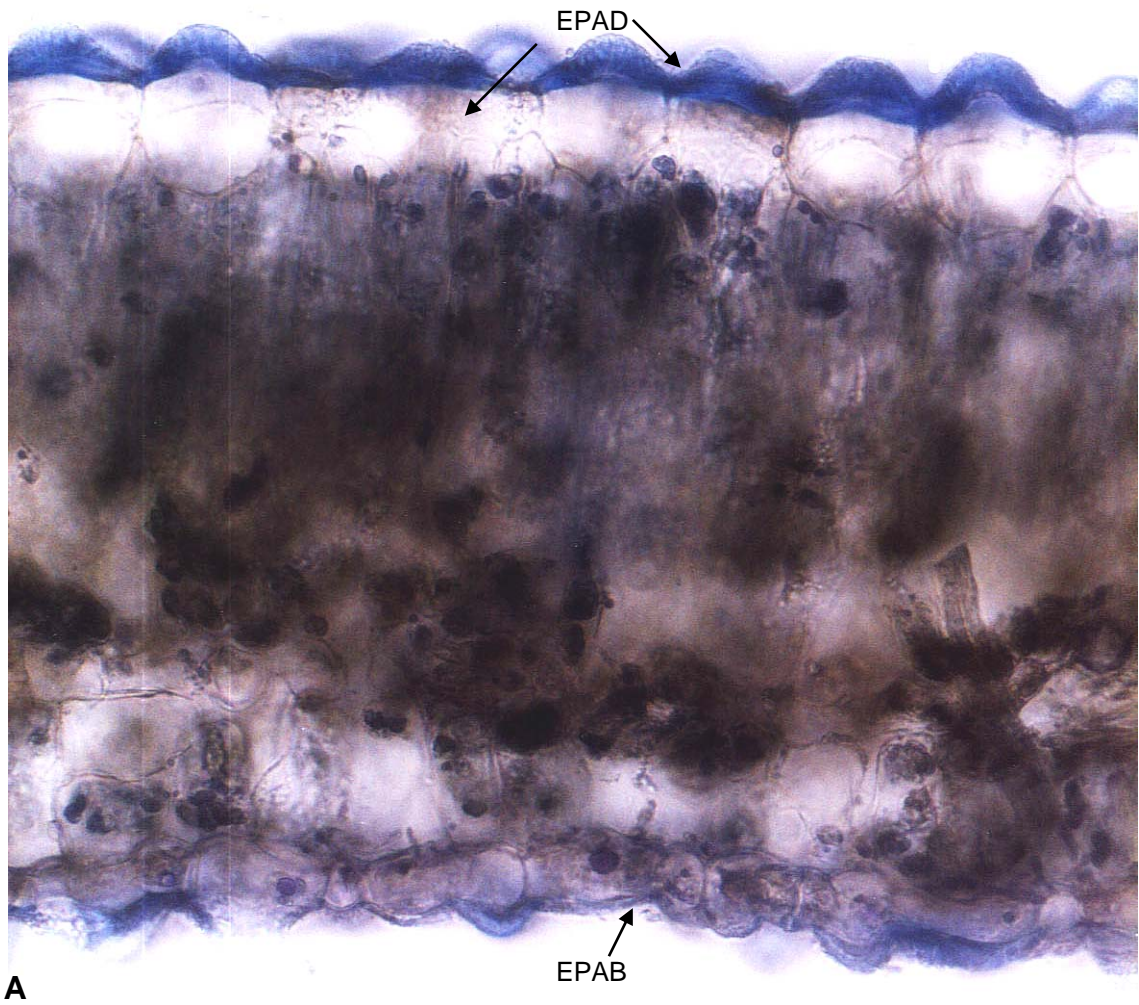


C



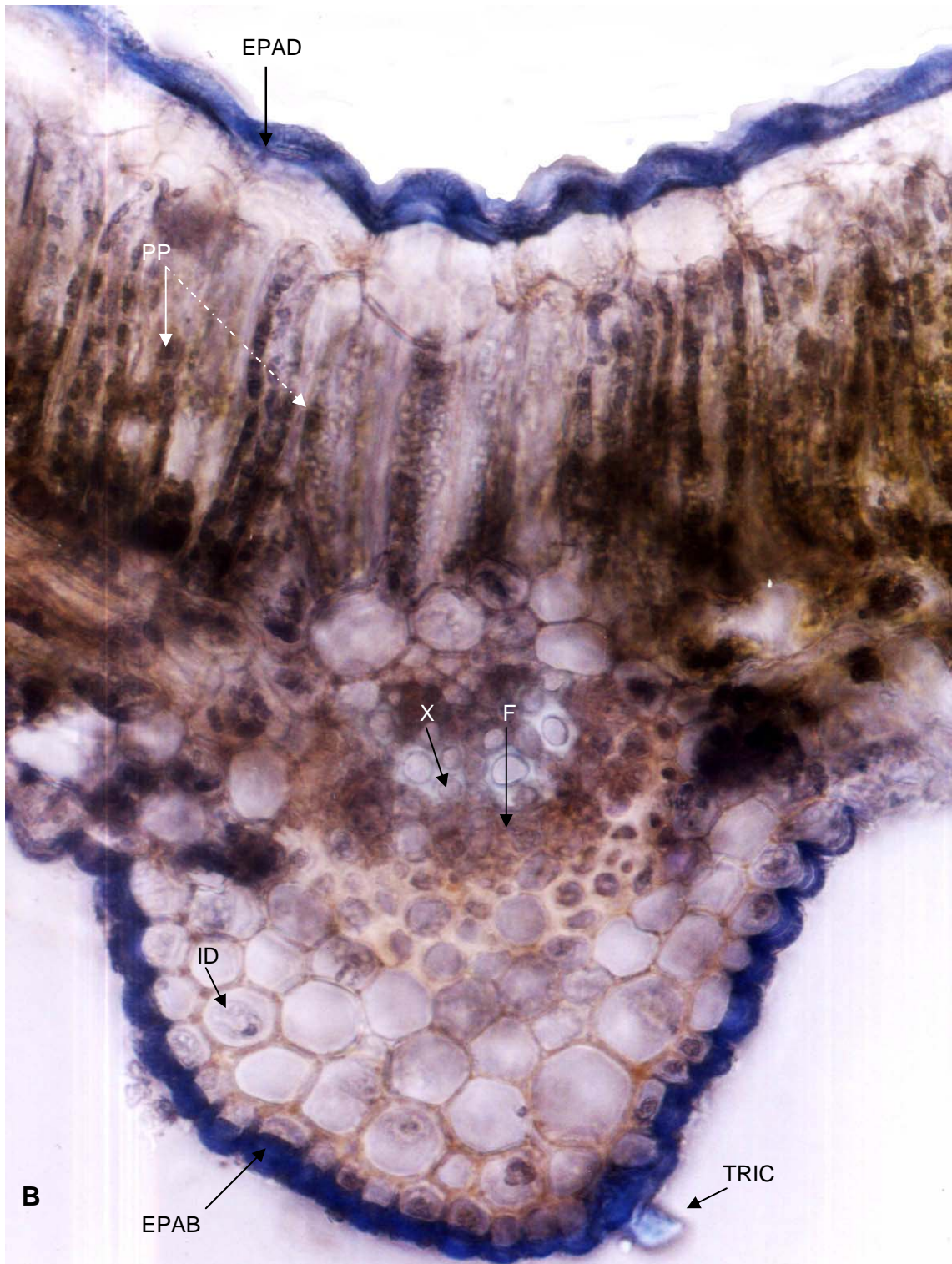
1.C. *D. gardneriana* (Sudan). Detalhe das epidermes adaxial e abaxial (EPAD E EPAB). D. Nervura mediana (NM) de *D. gardneriana*.

Figura 2: Reação de detecção de Óleos essenciais e resinas pelo Reagente de NADI nos tratamentos TR-DM e TR-DG (2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G).

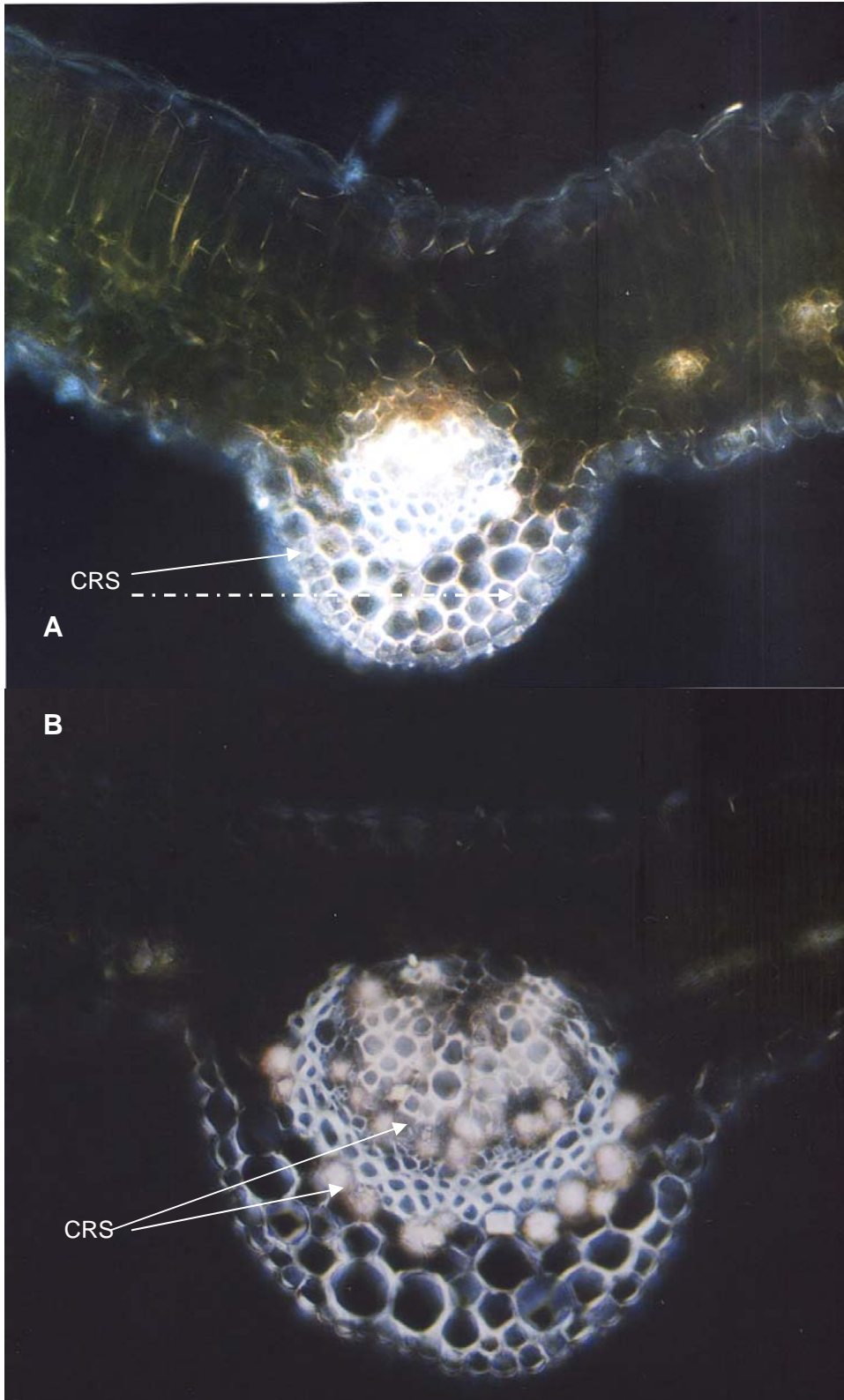


A

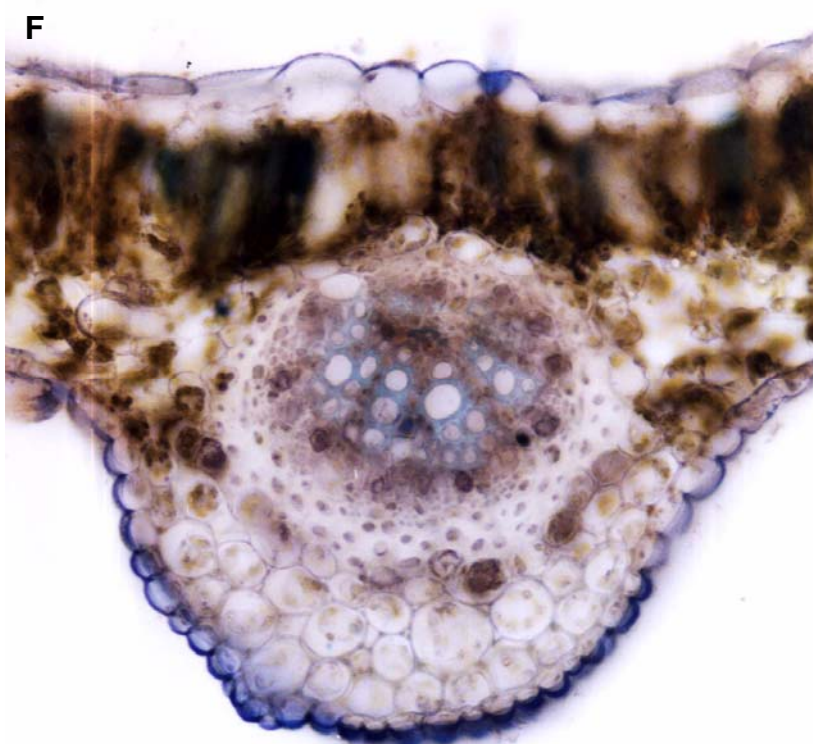
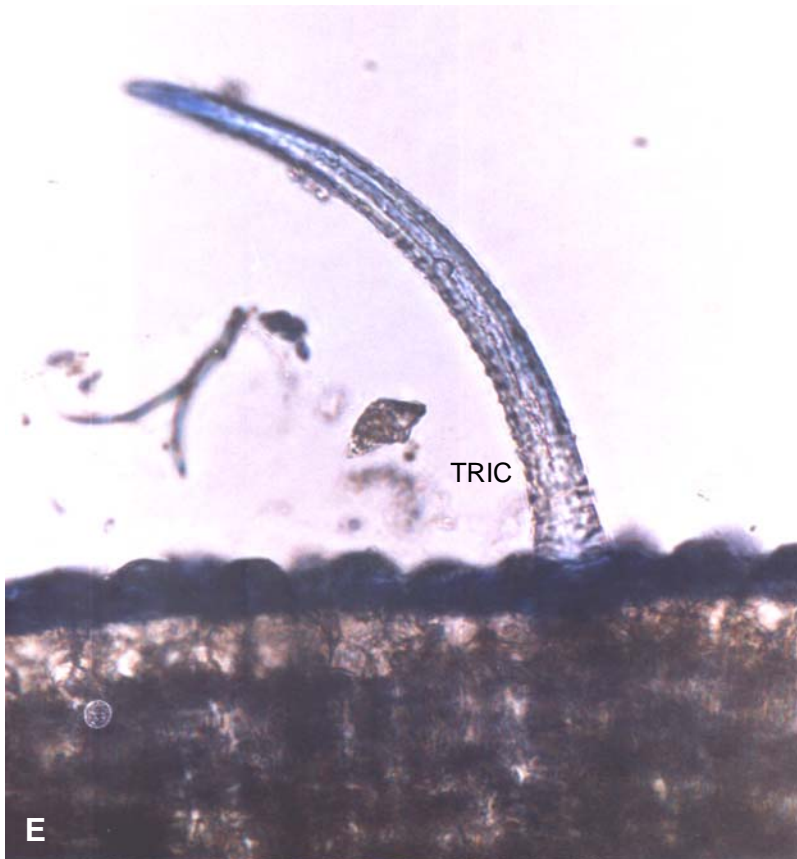
2. A. *D. mollis* (NADI). Detalhe das epidermes (adaxial - EPAD e abaxial - EPAB).



2. B. Nervura mediana de *D. mollis*, detalhe das células do feixe vascular – Floema (F) e Xilema (X); idioblastos (ID), Parênquima paliçádico (PP), Epidermes (EPAD, EPAB), tricomas (TRIC).



2.C. *D. mollis* (NADI). Detalhe da Nervura mediana sob luz polarizada. **D.** Detalhe dos cristais (CRS) sob luz polarizada.



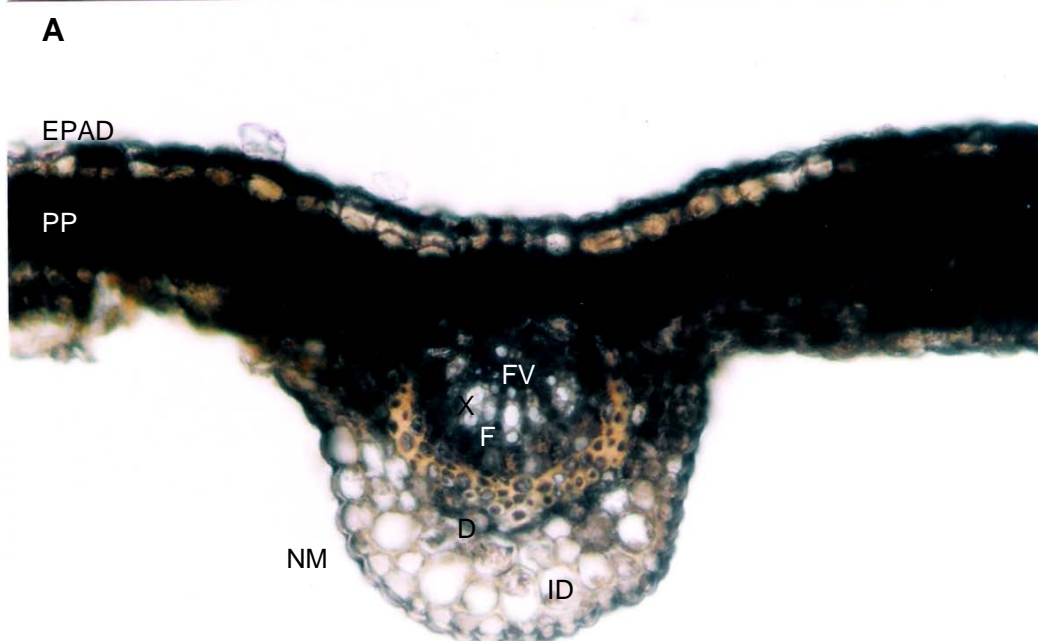
2.E. *D. mollis* (NADI). Detalhe dos tricomas (TRIC).

2.F. *D. gardneriana* (NADI). Detalhe da nervura mediana.

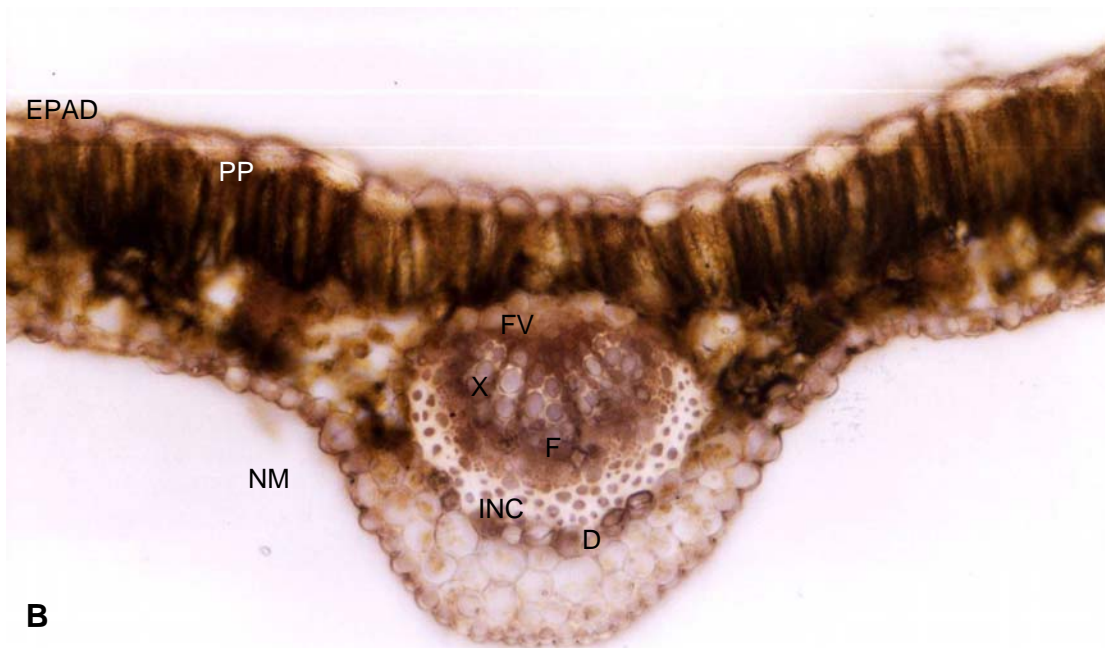


2.G. *D. gardneriana* (NADI). Detalhe da extremidade foliar.

Figura 3: Reações de identificação de compostos fenólicos nos tratamentos TR-DM (3A) e TR-DG (3B), por cloreto férrico e por dicromato de potássio.



3.A. *D. mollis*. Compostos fenólicos nas células da epiderme adaxial (EPAD), parênquima paliçádico (PP), nervura mediana (NM) e feixes vasculares (FV), nas paredes celulares do xilema (X) e floema (F). Detalhe de drusas (D) e idioblastos (ID).



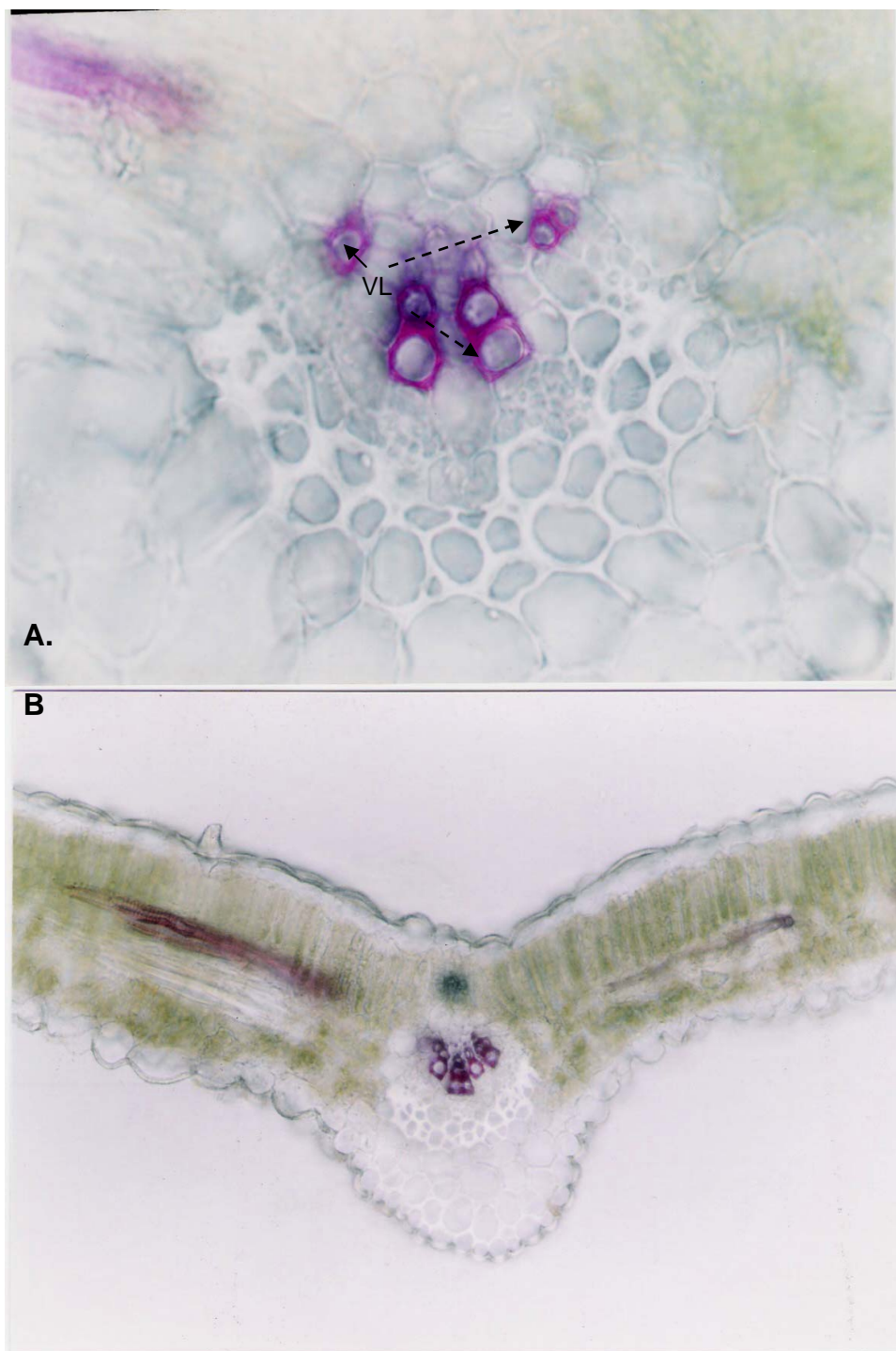
B

3.B. *D. gardneriana*. Compostos fenólicos nas células da epiderme adaxial (EPAD), parênquima paliçádico (PP), nervura mediana (NM) e feixes vasculares (FV), nas paredes celulares do xilema (X) e floema (F). Detalhe de drusas (D) e inclusões (INC).

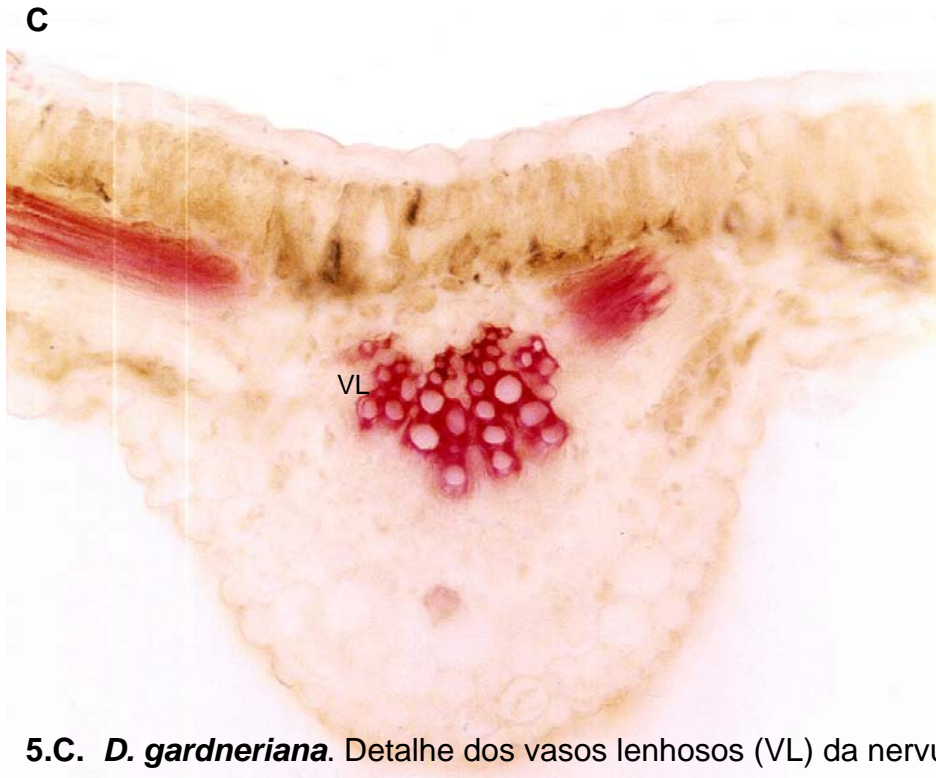


Figura 4. Reação de taninos por vanilina clorídrica em *D. gardneriana* (4A) (TR-DG)

Figura 5: Reação de detecção de Ligninas por Floroglucinol nos tratamentos TR-DM e de TR-DG.



5.A *D. mollis* Detalhe dos vasos lenhosos (VL) da nervura mediana. **5.B** Nervura mediana de *D. mollis*.



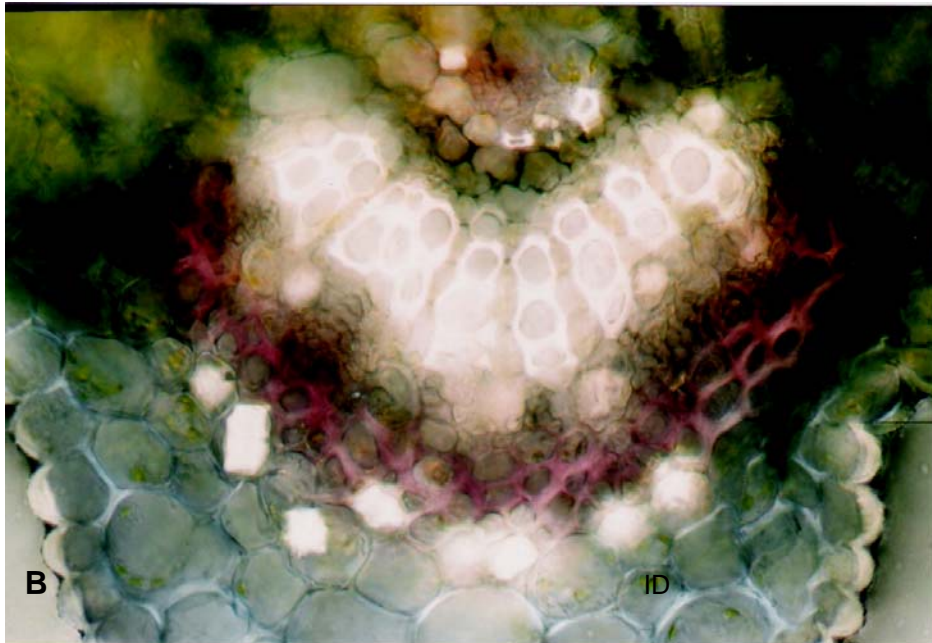
5.C. *D. gardneriana*. Detalhe dos vasos lenhosos (VL) da nervura mediana.

Figura 6. Reação de detecção de Pectinas com vermelho de rutênio no tratamento TR-DM.



A

6.A. *D. mollis*. Detalhe da bainha dos feixes vasculares (BFV), das paredes das células epidérmicas (EP).



6.B. *D. mollis*. Nervura mediana sob luz polarizada, detalhe dos idioblastos (ID).

Figura 7. Reação de detecção de Pectinas com vermelho de rutênio no tratamento TR-DG.



7.A. *D. gardneriana* detalhe das pectinas nas células da bainha do feixe vascular (BFV).

Quadro 1: Resultados de análise histoquímica de *Dimorphandra mollis* (TR-DM) e *Dimorphandra gardneriana* (TR-DG).

TESTES	REAÇÕES	TR-DM	TR-DG
Lípidios totais	Sudan	Positivo	Positivo
Lípidios ácidos	Sulfato Azul do Nilo	Positivo	Positivo
Óleos essenciais e resinas	Reagente de NADI	Positivo	Positivo
Esteróides	Tricloreto de Antimônio	Negativo	Negativo
Lactonas sesquiterpênicas	Ácido sulfúrico	Negativo	Negativo
Terpenóides gr. carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidrazina	Negativo	Negativo
Compostos fenólicos	Cloreto férrico	Positivo	Positivo
	Dicromato de potássio	Positivo	Positivo
Taninos	Vanilina Clorídrica	Positivo	Positivo
Ligninas	Floroglucinol	Positivo	Positivo
Alcalóides	Wagner	Negativo	Negativo
Polissacarídeos gerais	Ácido periódico	N.D.	N.D.
Amido	Lugol	Negativo	Negativo
Pectinas	Vermelho de rutênio	Positivo	Positivo
Mucopolissacarídeos ácidos	Azul de Alcian	N.D.	N.D.
Mucilagens	Ácido tânico	N.D.	N.D.
	Cloreto férrico		
Proteínas	Comassie blue	N.D.	N.D.

ND.=Não detectado

4.2. DISCUSSÃO

As Angiospermas possuem versatilidade nas estratégias de adaptação aos seus respectivos ambientes, entre as quais encontra-se o acúmulo de compostos de reserva e de defesa em suas folhas, caule, raízes, flores, frutos e sementes (BUCKERIDGE *et al*, 2000).

Estas substâncias são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento das plântulas, e seus produtos de degradação são utilizados em diversos propósitos, tais como a geração de energia e a produção de matéria-prima (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lípidios); na construção de novos tecidos e células; e como, mecanismos de proteção e defesa (herbivoria, patógenos e alelopatia) (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

Dentre as principais substâncias armazenadas pelas plantas, os polímeros de carboidratos são indicativos de características da evolução das espécies, uma vez que, esses açúcares são prontamente utilizados pelo metabolismo na geração de energia e também fornecem carbono na biossíntese das biomoléculas presentes em células vegetais.

Os polissacarídeos não foram detectados em folhas de *D. mollis* e em *D. gardneriana*, podendo ser relacionados à baixa disponibilidade de nutrientes de reserva em suas folhas, ficando mais concentrados em frutos, conforme

bibliografia consultada (BUCKERIDGE *et al*, 2000, 1995; CHAVES *et al*, 2001; PEDRIALI *et al*, 2005). Também não foi detectado amido (Reação de Lugol) que é particularmente relacionado à função de reserva, sendo mobilizado por hidrólise ou por mecanismos que envolvem a fosforilação direta de resíduos de glicose terminais (BUCKERIDGE *et al*, 2000).

Em *D. mollis* (TR-DM) e em *D. gardneriana* (TR-DG) foi detectada lignina circundando as células dos vasos lenhosos (xilema) da nervura central, conferindo às folhas, a flexibilidade necessária à adaptabilidade ao Cerrado, sem, no entanto, possuir caracteres xeromórficos como folhas coriáceas, suberosas ou extremamente duras, e ainda pode-se correlacionar ao fato de que o xilema é tecido com enorme proporção de lignina, conferindo mais resistência ao ataque de microrganismos.

A lignina é considerada substância resistente aos patógenos, pois dificulta sua colonização. A lignificação pode proporcionar aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedir a difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro ou de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno, e ainda, restringir a colonização por patógenos (SILVA, ALQUINI & CAVALLET, 2005).

As folhas de sombra podem ter menor proporção de tecido esclerenquimático. Tal variação pode ocorrer em função da quantidade dos tecidos esclerenquimáticos e vasculares das folhas no sentido da posição inferior a posição superior de disposição dos ramos. De modo geral as folhas mais jovens têm menor proporção de tecidos lignificados, porém há espécies em que o inverso ocorre. A proporção de lignina pode aumentar com o

acrécimo de temperatura, o que deveria ocorrer em *Dimorphandra mollis* e *D. gardneriana*.

Quimicamente as fibras são constituídas por polímeros de carboidrato (celulose e hemicelulose), pectinas, ligninas, cutinas que apenas podem ser digeridas pelos herbívoros que possuem enzimas específicas. Hemiceluloses, ligninas, pectinas são classificados como componentes insolúveis (YOSHIDA & KUWANO, 1989), sendo considerados recursos de defesa anti-herbivoria por agirem juntamente com cristais, taninos e ligninas reduzindo o aproveitamento do substrato vegetal, causando diminuição na absorção de proteínas (SELVENDRAN *et al*, 1989).

Folhas de *D. mollis* e de *D. gardneriana* têm tropismo de contato (tigmotropismo - movimentos foliares), característica histológica que ocorre em consequência da substituição dos tecidos floemáticos por colênquima e redução ou completa substituição das células do parênquima xilemático por elementos fibriformes vivos (FLEURAT-LESSARD & BONNEMAIN, 1978). Possuem também movimentos heliotrópicos, principalmente nos pulvinos primários e folíolos das folhas jovens. CALDAS *et al* (1997) constataram que o ajuste dos folíolos mantém as reações fotoquímicas em taxas elevadas, maximizando a eficiência fotossintética em condições adversas.

Em folhas de algumas espécies do Cerrado como *Pterodon pubescens*, a região cortical desenvolvida, a constituição exclusivamente parenquimática, com células situadas na porção mais periférica de conteúdo fenólico, a ausência de grãos de amido assim como paredes sinuosas ou dobradas e campos de pontuação primários amplos, conferem a espécie os movimentos

foliares (FLEURAT-LESSARD, 1988; MOYSSET & SIMON, 1991). TORIYAMA (1953) denominou tais células de “células motoras”.

Os eventos fisiológicos responsáveis pelos movimentos foliares em várias espécies de Leguminosas (Fabaceae) têm sido correlacionados com características estruturais, principalmente a existência de arranjo estrutural que assegura mudanças celulares rápidas, além de características peculiares das células motoras e do sistema vascular que facilitam tanto a sua deformação, quanto o fluxo lateral de íons potássio (K^+) e de água (SATTER *et al*, 1970; MORSE & SATTER, 1979; CAMPBELL & GARBER, 1980; FLEURAT-LESSARD, 1981; SATTER & GALSTON, 1981; FLEURAT-LESSARD & ROBLIN, 1982; FLEURAT-LESSARD & SATTER, 1985; MOYSSET & SIMÓN, 1991).

A formação da parede celular e sua estruturação estão diretamente correlacionadas à síntese dos seus componentes, como a pectina, a celulose e a lignina, presentes em maiores ou menores proporções em todas as células foliares.

Abundância de compostos fenólicos e escassez de grãos de amido nas células parenquimáticas, conforme observado em *D. mollis* e *D. gardneriana* (TR-DM e TR-DG), são características marcantes segundo ESAU (1965). A ocorrência de compostos fenólicos, principalmente taninos, nas células parenquimáticas estaria diretamente ligado à estocagem e liberação de íons, especialmente do cálcio, o qual está envolvido na agregação dos componentes do citoesqueleto, particularmente dos microfilamentos de actina em células motoras e interfere na percepção da gravidade (TORIYAMA & SATÔ, 1971; FLEURAT- LESSARD & MILLET, 1984; FLEURAT-LESSARD, 1988; KAMEYAMA *et al*, 2000; YAMASHIRO *et al*, 2001; MOYSSET & SIMÓN, 1991).

A Análise histoquímica dos tratamentos TR-DM e TR-DG revelou, que a flexibilidade das folhas, pode estar ainda correlacionada à interação do cálcio e pectinas (reação com vermelho de rutênio) formando o pectato de cálcio, substância representativa da rigidez das plantas e responsável pela coesão direta entre as células, mas indireta na coesão das células que contém lignina.

As resinas como detectado pelo reagente de NADI, nos tratamentos TR-DM e TR-DG, pode ser explicada pelo seu papel defensivo, pois estas são rapidamente depositadas nas células da epiderme, nos espaços intercelulares e no interior das células, formando barreira impenetrável que envolve completamente o patógeno (AGRIOS, 1997).

Assim pode-se atribuir às resinas, a reação positiva ao reagente de NADI, pois não foram detectadas estruturas secretoras de óleos essenciais, como tricomas glandulares, ductos ou canais secretores. Os tricomas detectados em *D. mollis* (TR-DM) são do tipo tector, simples, uniseriados localizados espaçadamente nas epidermes adaxial e abaxial, e, o conteúdo ergástico desses pode ser substâncias lipídicas (óleos essenciais, resinas) ou hidrofílicas (compostos fenólicos), pois foram coloridos positivamente por sudan e por cloreto férrico. Não foram detectados tricomas em *D. gardneriana*.

Outra característica interessante em *D. mollis* e *D. gardneriana* é a coesão dos tecidos parenquimáticos, atributo de plantas que podem expressar resistência aos patógenos, resistência física a insetos, mesmo sem possuir lignificação de suas células. A resistência nesse caso é atribuída à organização e às características das células e seu conteúdo, como por exemplo, flavonóides e taninos (NORIS & KOGAN, 1980). Segundo SILVA, ALQUINI & CAVALLET (2005) o parênquima compacto também interfere na distribuição de carbono, o que,

conseqüentemente, pode acarretar alteração na eficiência fotossintética (AKIN & ROBINSON, 1982; AGRIOS, 1988).

A reação ao Sudan detectou lipídios gerais, e, em sulfato azul do Nilo, gotículas de lipídios ácidos, na cutícula revestindo as células epidérmicas em ambos os tratamentos (TR-CM e TR- DG). A cutícula é a primeira barreira biológica da planta na defesa contra as infecções provocadas por agentes patogênicos desempenhando importante função na diminuição da perda de água por evaporação, e, sobre a cutícula, podem estar camadas de ceras epicuticulares que dão as folhas aspecto branco e ceroso (CARRAPIÇO, 1998). SILVA, ALQUINI & CAVALLET (2005) relatam que quanto mais espessa a cutícula e mais compacto o parênquima clorofiliano, mais resistente é a planta aos patógenos, e se for o caso de plantas forrageiras, essa condição pode reduzir a digestibilidade ruminal. Em *D. mollis* há relatos na bibliografia de intoxicação de bovinos, que pode ser causada pela relação cutícula/ alto teor de compostos fenólicos (rutina) (CHAVES *et al*, 2001; FARIA *et al*, 2005; POGGIANI, 1974).

Os aspectos histoquímicos estudados em *D. mollis* e *D. gardneriana* (TR-DM e TR-DG) correlacionam perfeitamente os mecanismos de defesa das espécies como resposta à produção de compostos secundários, principalmente no concerne aos compostos fenólicos e substâncias lipofílicas.

5. CONCLUSÕES

- Nas reações histoquímicas de caracterização de TR-DM e TR-DG detectaram-se lipídios totais, lipídios ácidos, compostos fenólicos (flavonóides, taninos, ligninas); pectinas e terpenóides (resinas).
- Os compostos secundários flavonóides e taninos (compostos fenólicos) em folhas de *Dimorphandra mollis* e *D. gardneriana*, encontram-se densamente distribuídos nos tecidos parenquimáticos, podendo, as folhas, funcionarem como fonte alternativa de obtenção de compostos fenólicos.
- Os resultados da análise histoquímica foram confirmados nos dados encontrados na triagem fitoquímica em *D. mollis* (capítulo 4).
- A caracterização histoquímica das espécies *D. mollis* e de *D. gardneriana* não permitiu localizar estruturas anatômicas que poderiam diferenciá-las estruturalmente, com exceção dos tricomas nas epidermes de *D. mollis*.
- Estudos anatômicos mais detalhados, bem como índices anatômicos poderão ser usados na tentativa de diferenciar histo-anatomicamente *D. mollis* de *D. gardneriana*.