

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO

**ANATOMIA DO CAULE (CASCA E LENHO), DA FOLHA E COLÉTER DE
Bathysa cuspidata (St. Hil.) Hook. f. (RUBIACEAE)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

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

T

C672a
2009

Coelho, Victor Peçanha de Miranda, 1980-
Anatomia do caule (casca e lenho), da folha e coléter de
Bathysa cuspidata (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae) / Victor
Peçanha de Miranda Coelho. – Viçosa, MG, 2009.
vii, 70f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Bathysa cuspidata* - Anatomia. 2. Plantas medicinais.
3. Histoquímica. 4. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro
(MG). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.93

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO

**ANATOMIA DO CAULE (CASCA E LENHO), DA FOLHA E COLÉTER DE
Bathysa cuspidata (St. Hil.) Hook. f. (RUBIACEAE)**

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

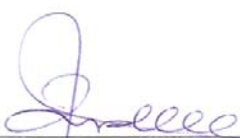
APROVADA: 17 de fevereiro de 2009



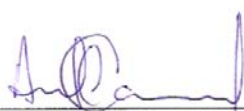
Prof^ª Aristéa Alves Azevedo




Prof^ª Flávia Cristina Pinto Garcia



Prof. Roberto Antonio Rodella



Prof^ª Ana Márcia M. L. Carvalho
(Co-Orientador)



Prof^ª Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, por me oferecerem condições para realização do Mestrado em Botânica.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, por terem compartilhado tanto conhecimento.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto Estadual de Floresta – IEF/MG, por ter autorizado as coletas de material botânico no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB).

À Prof^a. Dr^a. Marília Contin Ventrella, pela orientação, confiança, apoio, respeito, compreensão e amizade durante a realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra, pelos ensinamentos dentro e fora da academia, além da confiança, respeito e amizade durante minha vida acadêmica pré-mestrado. Serei eternamente grato!

Ao Prof. Dr. João Paulo Viana Leite, pela co-orientação e por todo apoio desde o “começo” deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Márcia M. L. Carvalho, pela co-orientação e por toda a ajuda no laboratório de anatomia da madeira.

Às Professoras Doutoras Aristéa Alves Azevedo e Flavia Cristina Pinto Garcia, pelas valiosas sugestões e pelas correções detalhadas dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella, pelas valiosas sugestões e pelas correções detalhadas dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Rivete Lima pelo apoio e constante incentivo.

À senhora Edite Fernandes da Silva técnica do laboratório de anatomia, pelos ensinamentos e bons momentos no dia-a-dia do laboratório.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Biologia Vegetal: Ângelo Valentim Lopes e Francine Rodrigues Silveira Ribeiro, sempre muito eficientes e atenciosos.

Ao Joel e Wesley pelos ensinamentos e agradáveis momentos no laboratório de anatomia da madeira.

Aos funcionários do Herbário VIC, Gilmar Edilberto Valente e Maurício Lopes Cardoso, pela maneira atenciosa pela qual fui tão bem tratado.

Aos funcionários do Horto Florestal Celso Antônio da Costa e José do Carmo Silva, sempre muito prestativos em me ajudar.

Às funcionárias Cláudia e Carla do núcleo de microscopia e microanálise (NMM) da UFV.

Ao Branco e Fernando IEF/MG, pela receptividade e atenção no trabalho de campo na Serra do Brigadeiro.

Ao Sr. Dico pelo apoio durante as coletas em sua propriedade na Serra do Brigadeiro.

Ao Ilustrador Reinaldo Pinto pela destreza, profissionalismo e arte com a qual ilustrou esse trabalho.

À Gláucia Tolentino e Evelyn Jardim, pelas versões dos resumos em inglês.

Ao Clébio pela revisão dos manuscritos.

Aos amigos de Pós-graduação Luiz, Clébio, Elyabe, Diego, Tiago, Bruno e Vinícius, pelos bons momentos de convívio e aprendizado.

Às amigas da Pós-graduação Alice, “Patrícias”, Cristina, Marina, Tuane, Naiara, Flávia, Karina, Jaqueline, Dayana, Rúbia, Jaquelina, Claudinéia, Ana, Lourdes e Juliana pelos bons momentos de convívio e aprendizado.

Ao amigo Márcio Miranda, um irmão em Viçosa.

Ao amigo e professor fluminense Pedro Paulo de Souza, por tornar o trabalho em grupo agradável e muito mais produtivo e acima de tudo os ensinamentos na “arte da vida”.

Aos amigos mineiros Advanio Inácio S. da Silva e Joseane Bessa Barbosa pelo grande companheirismo e ajuda nas atividades do laboratório de anatomia.

Aos amigos paraibanos Ailton (Preto), Arlindo, George, Kiriaki, Ionaldo, Emerson e Ricardo pelos bons momentos juntos e por todo incentivo.

Aos meus irmãos Artur e Hugo, pelo apoio nas horas mais difíceis de minha vida.

À Danielle Tavares minha grata surpresa na fase final desse trabalho.

Aos meus pais Jairo Artur e Elaine Peçanha por todo apoio.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, meus respeitos e sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO, filho de Jairo Artur de Miranda Coelho e Elaine Peçanha de Miranda Coelho, nasceu em João Pessoa - PB, no dia 29 de maio de 1980.

Completo o Primeiro Grau no Colégio ECO em João Pessoa - PB, em dezembro de 1996 e o Segundo Grau no Colégio Anglo da mesma cidade, em dezembro de 1999.

Em agosto de 2001 ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, graduando-se em setembro de 2006.

Em março de 2007 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela Universidade Federal de Viçosa - UFV, Minas Gerais. Submetendo-se a defesa e aprovação da dissertação no dia 17 de fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

| | página |
|---|-----------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 4 |
| CAPÍTULO 1: Anatomia da folha e casca do caule de <i>Bathysa cuspidata</i> (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae) | 7 |
| Resumo | 7 |
| Introdução | 8 |
| Material e Métodos | 9 |
| Resultados | 12 |
| Discussão | 27 |
| Conclusões | 31 |
| Referências Bibliográficas | 32 |
| CAPÍTULO 2: Anatomia do lenho do caule de <i>Bathysa cuspidata</i> (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae) | 37 |
| Resumo | 37 |
| Introdução | 38 |
| Material e Métodos | 39 |
| Resultados | 41 |
| Discussão | 48 |
| Conclusões | 50 |
| Referências Bibliográficas | 51 |
| CAPÍTULO 3: Coléteres em <i>Bathysa cuspidata</i> (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae): estrutura, desenvolvimento e histoquímica | 54 |
| Resumo | 54 |
| Introdução | 55 |
| Material e Métodos | 56 |
| Resultados | 57 |
| Discussão | 64 |
| Conclusões | 67 |
| Referências Bibliográficas | 68 |

RESUMO

COELHO, Victor Peçanha de Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Anatomia do caule (casca e lenho), da folha e coléter de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (RUBIACEAE).** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Co-Orientadores: João Paulo Viana Leite e Ana Márcia Macedo Ladeira Carvalho.

Bathysa (Rubiaceae), juntamente com as plantas que possuem cascas amargas de coloração avermelhada ou amarela, usadas como tônicas ou febrífugas são conhecidas como falsas quinas. No Brasil, *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. é conhecida popularmente como “quina-do-mato” e tem a casca do caule usada na medicina popular para doenças do estômago, fígado e como cicatrizante. Este trabalho vem contribuir com informações sobre a anatomia e histoquímica do caule (casca e lenho), da folha e dos coléteres presentes nos ápices vegetativos. O estudo foi conduzido no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Município de Araponga, Estado de Minas Gerais. Para a análise estrutural as amostras foram processadas de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Para análise histoquímica amostras frescas foram submetidas a diversos corantes e reagentes. A região medial da nervura principal possui o feixe medular central com rotação conspícua em seu eixo, sendo esse um caráter anatômico consistente para identificação de *B. cuspidata*. O estudo histoquímico demonstrou que existe semelhança entre os metabólitos de interesse encontrados nas folhas e na casca do caule, principalmente em relação aos compostos de natureza fenólica, o que torna a folha um potencial farmacógeno nessa espécie. O lenho foi classificado como tipo II de lenho em Rubiaceae, caracterizado principalmente pela presença de fibras libriformes septadas. Os índices de vulnerabilidade e mesomorfia do lenho indicam que os espécimes estudados estão adaptados às condições méxicas da Serra do Brigadeiro. Os coléteres, geralmente, são do tipo padrão, mas também foram observados coléteres bifurcados, descritos anteriormente, apenas para Apocynaceae e reportados pela primeira vez em Rubiaceae. Começam a secretar com a expansão dos primórdios foliares, mantendo-se funcionais até a senescência. As estípulas são caducas, caem com a expansão das folhas jovens e os coléteres nessa fase secam e murcham. A origem dos coléteres é mista, envolvendo a protoderme, o procâmbio e o meristema fundamental. Em todas as amostras analisadas, os testes histoquímicos detectaram polissacarídeos, pectinas, compostos fenólicos e proteínas.

ABSTRACT

COELHO, Victor Peçanha de Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2009. **Anatomy of stem (bark and wood), leaf and colleter of *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (RUBIACEAE).** Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Ana Márcia Macedo Ladeira Carvalho.

Bathysa (Rubiaceae), along with other plants with bitter bark of red or yellow color, used as tonic and febrifuge are known as false Quina. In Brazil, *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. is popularly known as "quina do mato" (quina of the fields) and the stem bark is used in folk medicine for stomach and liver ailments and healing. This work contributes with information on anatomy and histochemistry of stem (bark and wood), leaf and colleters present in the vegetative shoot apices. The study was carried out in the Serra do Brigadeiro State Park (PESB), in the municipality of Araponga, Minas Gerais. Structural analysis of samples was performed using usual techniques of light and scanning electron microscopy. Histochemical analysis of fresh samples was carried out using different stains and reagents. The middle region of the primary vein has the central medullary bundle with conspicuous rotation on its axis, which is a consistent anatomical characteristic for *B. cuspidata* identification. The histochemical study showed similarity among metabolites of interest found in leaves and stem bark, particularly phenolic compounds, which makes the leaf a potential source of bioactive metabolites in this species. The wood was classified as type II wood in Rubiaceae, which is mainly characterized by septate libriform fibers. Vulnerability indexes and wood mesomorphy indicate that the studied specimens are adapted to the mesic conditions prevailing in the Brigadeiro Range. The colleters, in general, were of the standard type, but bifurcated colleters were also observed as previously described only in Apocynaceae and here reported for the first time in Rubiaceae. Colleters start to secrete with the expansion of the leaf primordia and remain functional until leaf senescence. Stipules are deciduous, falling with the expansion of young leaves and the colleters dry and wilt in this phase. Colleter origin is mixed, involving the protoderm, the procambium and ground meristem. The histochemical tests detected polysaccharides, pectins, phenolic compounds and proteins in all samples.

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial que mora em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para cuidado médico primário (Akerele 1993). As plantas medicinais são amplamente distribuídas pelo mundo, sendo os países tropicais, como o Brasil, seus principais centros de diversidade. Atualmente, profissionais de saúde e pesquisadores demonstram interesse na investigação das plantas medicinais visando à obtenção de modelos moleculares para síntese de novas substâncias ativas, desenvolvimento de fitofármacos (substâncias ativas purificadas) e de fitoterápicos padronizados. Para isso, se faz necessário o embasamento técnico-científico no intuito de se avaliar a eficácia e os possíveis riscos das plantas em uso, o que envolve estudos botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos, além de técnicas de controle de qualidade, no caso da comercialização de plantas como drogas vegetais.

Extratos e formas farmacêuticas derivadas requerem análises mais sofisticadas, principalmente quando contém misturas de drogas vegetais. Nesse caso a autenticidade do produto é dada exclusivamente pela sua composição química. Na análise de matérias-primas *in natura* ou drogas vegetais os procedimentos são mais simples, sendo as adulterações e as contaminações os problemas mais encontrados. Eles são decorrentes, em grande parte, da atual forma de exploração das plantas medicinais e da falta de controle de qualidade. De um modo geral, são utilizadas plantas silvestres, de acordo com as necessidades dos laboratórios, sem épocas ou locais definidos de coleta. Um outro fato que contribui para isso é a utilização da denominação popular, tanto na comercialização quanto na aquisição da matéria-prima. Os nomes populares das plantas são muitas vezes regionais, variando de um lugar para outro. É também comum, diferentes espécies vegetais apresentarem a mesma denominação regional ou uma única espécie ter diferentes denominações populares. Além disso, algumas espécies são morfologicamente semelhantes, diferenciando-se apenas por detalhes que, dependendo do profissional envolvido, torna-se muito difícil a identificação. É imprescindível, portanto, que todo o material adquirido pelos laboratórios seja analisado por profissionais capacitados, atestando a autenticidade e a qualidade da matéria-prima (Farias et al. 1985).

A família Rubiaceae, com aproximadamente 611 gêneros e cerca de 13.200 espécies (World Checklist of Rubiaceae 2008), é a maior em número de espécies da ordem Gentianales. Destaca-se como uma das maiores famílias das Angiospermas, ocupando o quarto lugar em diversidade, perdendo apenas para Asteraceae, Orchidaceae

e Fabaceae (Mabberley 1997). Atualmente está subdividida em duas subfamílias: Cinchonoideae e Rubioideae, caracterizadas quimicamente pela presença de alcalóides indólicos e antraquinonas, respectivamente (Robbrecht e Manen 2006).

Algumas espécies de Rubiaceae possuem grande importância econômica, sendo usadas como fonte de alimento (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), como ornamentais (espécies dos gêneros *Ixora*, *Mussaenda* e *Gardenia*) e também na indústria farmacêutica, ao exemplo da *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, alcalóide empregado no tratamento da malária (Coelho et al. 2006). Da casca do caule e da raiz de espécies de *Cinchona* são extraídos mais de vinte alcalóides, dentre os quais dois pares de diastereoisômeros, quinina e quinidina, cinchonina e cinchonidina, têm atividade antimalárica (Da Silva et al. 2005). No século XIX, no intuito de se obter novas fontes de quinina um grande número de “quinologistas” foi enviado da Europa para a América do Sul para procurar espécies do gênero *Cinchona* e muitos táxons relacionados (falsas quinas) (Delprete 1997).

Espécies do gênero *Bathysa*, juntamente com as plantas que possuem cascas amargas de coloração avermelhada ou amarela, usadas como tônicas ou febrífugas são conhecidas como falsas quinas. Estas diferem das verdadeiras quinas por não possuírem uma porcentagem mínima do quinino prevista pelo código farmacêutico (Cunha 1937).

Bathysa pertence a tribo Rondeletieae, subfamília Cinchonoideae, a mesma subfamília das tradicionais “quinas” historicamente usadas contra malária. Atualmente possui 15 espécies de árvores, arvoretas e arbustos exclusivamente neotropicais, ocorrendo sempre em formações florestais em altitudes entre 600-800(1100) m. O caule é ereto de casca parda, castanho-acinzentada ou avermelhada. Os ramos podem ser cilíndricos ou tetragonos, glabros ou pilosos, com estrias longitudinais e lenticelas esparsas e longitudinalmente alongadas. As folhas são decussadas, ovadas, obovadas, oblanceoladas ou elípticas, chegando até cerca de 1 m de comprimento. As estípulas das folhas em desenvolvimento possuem coléteres que secretam mucilagem (Germano-Filho 1999).

No Brasil, existe registro de sete espécies: *B. australis* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. f., *B. gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. nicholsonii* K. Schum., *B. stipulata* (Vell.) J. Presl e *B. sylvestrae* Germano-Filho & M. Gomes, todas exclusivamente de Floresta Atlântica das regiões sudeste e sul do país. No Estado de Minas Gerais existem quatro espécies de *Bathysa*: *B. australis*, *B. cuspidata*, *B. nicholsonii* e *B. stipulata* (Germano-Filho 1999). Dentre as espécies do gênero, escolheu-se *B. cuspidata* como objeto de estudo, pois tem sido citada em

levantamentos etnobotânicos por ter a casca do caule usada como tônica, febrífuga, para doenças do estômago, fígado e como cicatrizante (Botsaris 2007, Leite et al. 2008).

Somando-se a este fato, não foram encontrados estudos anatômicos com a casca do caule de nenhuma espécie do gênero *Bathysa*, bem como os estudos sobre anatomia foliar carecem de maior detalhamento (Nascimento et al. 1996, Gomes et al. 2000). Desde a década de 70, têm sido realizados vários estudos com anatomia da madeira e com coléteres na família Rubiaceae (Koek-Noorman 1970, Koek-Noorman 1972, Koek-Noorman e Hogeweg 1974, Koek-Noorman e Puff 1983, Lersten 1974a, 1974b, 1975). O interesse nessa área continua até os dias atuais, pois tem gerado informações valiosas, bem como implicações na sistemática da família (Ceccantini e Angyalossy-Alfonso 2000, Jansen et al. 2002, Ceccantini e Iwasaki 2002, Luchi 2003, Froufe et al. 2005, Thomas 1991, Barreiro e Machado 2007).

O objetivo do presente estudo é caracterizar anatômica e histoquimicamente o caule (casca e lenho), as folhas e os coléteres de *B. cuspidata*, fornecendo subsídios para a validação da espécie como medicinal, para o controle de qualidade e a identificação da droga vegetal. A histolocalização dos principais grupos de compostos naturais, que possivelmente estão ligados às propriedades químico-farmacológicas atribuídas à espécie, auxiliará estudos futuros na área de produtos naturais e sintéticos bioativos em Rubiaceae, bem como configura passo importante para indicação da folha como farmacógeno substituto da casca.

O trabalho foi redigido na forma de três capítulos, intitulados: “Anatomia da folha e casca do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae)”, “Anatomia do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae)” e “Coléteres em *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae): estrutura, desenvolvimento e histoquímica”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERELE O. 1993. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram* 28: 13-19.
- BARREIRO DP e MACHADO SR. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 30(3): 387-399.
- BOTSARIS AS. 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 3: 18.
- CECCANTINI GCT e ANGYALOSSY-ALFONSO V. 2000. Perforated ray cells in *Bathysa meridionalis* (Rubiaceae). *IAWA Journal* 21(1): 77– 82.
- CECCANTINI GCT e IWASAKI C. 2002. A new method for the preparation and examination of perforated ray cells. *IAWA Journal* 23(3): 327–331.
- COELHO VPM, AGRA MF e BARBOSA MRV. 2006. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 170-177.
- CUNHA NS. 1937. Uma perícia farmacognóstica e falsas quinas do Brasil. *Revista da associação brasileira de farmacêuticos RJ* 18(4): 156-168.
- DA SILVA THA, DE OLIVEIRA MT, DOS SANTOS HF, DE OLIVEIRA AB e DE ALMEIDA WB. 2005. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. *Quim. Nova* 28(2): 244-249.
- DELPRETE PG. 1997. Notes on calycophyllous Rubiaceae. Part II. Morphological comparison of the genera *Bathysa* and *Schizocalyx*. *Brittonia* 49(4): 480-486.
- FARIAS MR., SCHENKEL EP, BERGOLD AM e PETROVICK PR. 1985. O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia* 1(2): 73-82.
- FROUFE LCM, RIBAS DT, MORAES TMS, BARROS CF e CUNHA M. 2005. Determinação da aptidão de espécies dos gêneros *Bathysa* e *Coussarea* (Rubiaceae) da Floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro para a produção de papel. In: XXIV Jornada Fluminense de Botânica, Nova Friburgo, RJ.

- GERMANO-FILHO P. 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C.Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. *Rodriguésia* 50(76/77): 49-75.
- GOMES DMS, ARRUDA RCO, GOMES M e VIEIRA RC. 2000. Anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. e *B. australis* (St. Hil.) Hook. F (Rubiaceae) da Mata Atlântica, RJ, Brasil. *Leandra* 15: 59-72.
- JANSEN S, ROBBRECHT E, BEECKMAN H e SMETS E. 2002. A survey of the systematic wood anatomy of the Rubiaceae. *IAWA Journal* 23(1): 1-67.
- KOEK-NOORMAN J. 1970. A contribution to the wood anatomy of the Cinchoneae, Coptosapelteae and Naucleaeae (Rubiaceae). *Acta Bot. Neerl.* 19: 154–164.
- KOEK-NOORMAN J. 1972. The wood anatomy of Gardenieae, Ixoreae and Mussaendeae (Rubiaceae). *Acta Bot. Neerl.* 21: 301–320.
- KOEK-NOORMAN J e HOGEWEG P. 1974. The wood anatomy of Vanguerieae, Cinchoneae, Condamineae and Rondeletieae (Rubiaceae). *Acta. Bot. Neerl.* 23: 627–653.
- KOEK-NOORMAN J e PUFF C. 1983. The wood anatomy of Rubiaceae tribes Anthospermeae and Paederieae. *Pl. Syst. Evol.* 143: 17– 45.
- LEITE JPV, FERNANDES JM, FÁVARO LB, GONTIJO DC, MAROTTA CPB, SIQUEIRA LC, MAIA RT e GARCIA FCP. 2008. Plantas medicinais do entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG BIOTA* 1(4): 16-34.
- LERSTEN NR. 1974a. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 69: 125–136.
- LERSTEN NR. 1974b. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973–981.
- LERSTEN NR. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71: 311–319.
- LUCHI AE. 2003. Unusual perforation plates in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. *Hoehnea* 30(2): 121-125.
- MABBERLEY DJ. 1997. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants.* Cambridge University Press, Cambridge, 874 p.

NASCIMENTO MVD, GOMES DMS e VIEIRA RC. 1996. Anatomia foliar de *Bathysa stipulata* (Vell.) Presl. (Rubiaceae). Unimar 18: 387-401.

ROBBRECHT E. e MANEN JF. 2006. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position de *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. Systematics and Geography of Plants 76: 85-146.

THOMAS V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.

WORLD CHECK LIST OF RUBIACEAE. 2008. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/reportbuilder.do?method=Reset>. Acessado em: 15/10/2008.

CAPÍTULO 1

Anatomia da folha e casca do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae)

RESUMO – No Brasil, *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. é conhecida popularmente como “quina-do-mato” e tem a casca do caule usada na medicina popular como tônica, febrífuga, para doenças do estômago, fígado e como cicatrizante. Este trabalho teve como objetivo a caracterização anatômica e histoquímica da folha e casca do caule de *B. cuspidata* de modo a subsidiar a correta identificação da droga vegetal, além de identificar os principais sítios de acúmulo dos metabólitos de interesse em busca de semelhanças entre a folha e a casca do caule. Para caracterização anatômica, amostras da casca do caule e folhas foram fixadas em FAA₅₀ e em formalina 4% em sulfato ferroso 10% por 48 horas, sendo estocadas em etanol 70% e incluídas em metacrilato. Foram obtidas secções transversais e paradérmicas (folha) e transversais e longitudinais tangenciais e radiais (casca) em micrótomo rotativo (5µm), posteriormente coradas com azul de toluidina e montadas com resina sintética. Para o estudo da venação e das células epidérmicas, folhas frescas foram diafanizadas. A técnica de dissociação de epiderme foi aplicada para complementar a análise do tecido epidérmico. Realizou-se o macerado da casca para o estudo de elementos dissociados. Para a caracterização micromorfológica da folha, amostras foram fixadas em FAA₅₀ e processadas de acordo com técnicas usuais em microscopia eletrônica de varredura. Para a análise histoquímica, folhas frescas e cascas congeladas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa e submetidas a diversos corantes e reagentes. O estudo anatômico de *B. cuspidata* revelou que as folhas e casca do caule seguem as características gerais da família Rubiaceae reportadas na literatura. A região medial da nervura principal possui o feixe medular central com as margens fletidas para o centro e rotação conspícua em seu eixo, sendo apontado como o caráter anatômico mais consistente para identificação de *B. cuspidata*, a partir de material estéril ou até mesmo fragmentos de folhas. O estudo histoquímico demonstrou que existe semelhança entre os metabólitos de interesse encontrados nas folhas e na casca do caule, principalmente em relação aos compostos de natureza fenólica, o que torna a folha um potencial farmacógeno nessa espécie. Os dados obtidos podem servir não só para procedimentos de identificação que garantem a utilização da matéria-prima apropriada, mas também para adequação aos padrões de controle de qualidade.

Introdução

Bathysa possui 15 espécies de árvores, arvoretas e arbustos exclusivamente neotropicais, ocorrendo sempre em formações florestais em altitudes entre 600-800(1100) metros (Germano-Filho 1999). Pertence à tribo Rondeletieae, subfamília Cinchonoideae, a mesma subfamília das tradicionais “quinas” historicamente usadas contra malária.

Espécies do gênero *Bathysa*, juntamente com as plantas que possuem cascas amargas de coloração avermelhada ou amarela, usadas como tônicas ou febrífugas, são conhecidas como falsas quinas. Estas diferem das verdadeiras quinas por não apresentarem uma quantidade mínima do quinino prevista pelo código farmacêutico (Cunha 1937).

Bathysa cuspidata é conhecida popularmente como “quina”, “quina-do-mato” e “quina-cinzenta”. Alguns levantamentos etnobotânicos têm citado a casca do caule como tônica, febrífuga, para doenças do estômago, fígado e como cicatrizante (Botsaris 2007, Leite et al. 2008). O extrato etanólico das cascas do caule de *B. cuspidata* possui alcalóides e cumarinas. Triterpenos, esteróides, flavonóides e taninos foram encontrados tanto nas folhas como na casca do caule desta espécie. A casca do caule de *B. cuspidata* destaca-se por apresentar um alto teor de proantocianidinas (3,79%) dentro de um total de polifenóis (5,87%) (Nunes 2008). O extrato etanólico e a fração diclorometânica das folhas dessa espécie também possuem importância químico-farmacológica, tendo registro de atividade antinociceptiva e antiinflamatória (Vanderlinde et al. 2001).

Atualmente existe uma preocupação ambiental quanto ao emprego de cascas no preparo de medicações, cuja coleta indiscriminada pode levar ao risco de extinção de espécies. Dessa forma, faz-se importante avaliar a atividade biológica de outro farmacógeno (parte da planta empregada para o preparo da droga vegetal), como as folhas. Caso esses apresentem composição fitoquímica semelhante a casca, bem como segurança e eficácia comparável, poder-se-ia utilizar preferencialmente as folhas no preparo dos medicamentos, uma vez que se trata de material vegetal de maior renovação, o que contribuiria para o manejo sustentável das espécies (Nunes 2008). Além da preocupação ambiental, estudos farmacognósticos de espécies usadas na medicina tradicional ou popular que possam vir a ser industrialmente importantes são imprescindíveis, pois estes irão garantir a utilização da matéria-prima apropriada, como também a adequação do farmacógeno aos padrões de controle de qualidade exigidos pela legislação. No Brasil, a regulamentação para a comercialização de fitoterápicos é regida por legislação específica, como as portarias da Vigilância Sanitária e por

monografias para algumas espécies vegetais, que contêm critérios definidos para identidade, pureza e teor de constituintes químicos. Embora se tenha parâmetros específicos para a produção e comércio de fitoterápicos, a fraude e a má qualidade têm preocupado profissionais da área de saúde, e a comunidade científica. A ausência de qualidade, a adulteração e a incorreta utilização, interferem na eficácia e até mesmo na segurança do produto (De Melo et al. 2004).

Não foram encontrados estudos anatômicos com a casca do caule de espécies de *Bathysa*, bem como os estudos sobre anatomia foliar (Nascimento et al. 1996, Gomes et al. 2000) não apontam claramente que características diagnósticas devem ser usadas para o reconhecimento das espécies. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a folha e a casca do caule de *Bathysa cuspidata*, dando subsídios para a validação da espécie como medicinal, bem como o controle de qualidade e a identificação da droga vegetal. Tendo em vista o potencial uso da folha como farmacógeno investigou-se as similaridades histoquímicas entre folha e casca.

Material e Métodos

Material vegetal e local de coleta

Foram coletadas folhas do 2° ao 5° nós e cascas à altura do peito de três indivíduos adultos localizados na propriedade de “Seu Dico” no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), próximo ao Pico do Boné (20° 43’ 00,0’’ S e 42° 29’ 10,8’’ W, 1.200 m altura), município de Araponga, Minas Gerais. A licença para a realização de coleta de material vegetal no entorno de unidade de conservação foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta (UC 073/07). A vegetação florestal existente na Serra do Brigadeiro é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa (Velloso et al. 1991). O clima da região é do tipo Cw_b de Köpen – mesotérmico, com verões frescos e chuvosos e invernos frios e secos. A temperatura média anual é de 18°C e a precipitação média anual é de cerca de 1.300 mm. Os tipos de solo predominantes são: Latossolo Vermelho-Amarelo, Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico, Cambissolos e Litossolos (Engevix 1995). As amostras coletadas no PESB foram divididas em quatro partes: (1) constituída de ramos foi herborizada e posteriormente depositada como material testemunho no Herbário VIC da UFV, em Viçosa, MG, sob o número de registro VIC 21.445; (2) constituída de folhas e cascas, foi fixada na área de estudo para caracterização estrutural; (3) constituída apenas

de cascas foi congelada a -17°C para testes histoquímicos; e (4) constituída de mudas de 20 a 40 cm coletadas nas imediações dos indivíduos amostrados. As mudas foram transplantadas para vasos plásticos com aproximadamente 3,5 litros, contendo substrato do local de coleta. Os vasos foram mantidos no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal, sob sombrite com 50% de cobertura, e regadas com água a cada dois dias para posterior realização dos testes histoquímicos.

Microscopia de luz

Para caracterização anatômica, porções de folhas totalmente expandidas (regiões basal, medial e apical do limbo e do pecíolo) e cascas foram fixadas em FAA₅₀ ou formalina 4% em sulfato ferroso 10% por 48 horas, sendo estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). Posteriormente, procedeu-se desidratação em série etílica crescente e inclusão em metacrilato (Historesin, Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. Secções transversais e longitudinais da folha e da casca foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), com 5 μm de espessura, coradas com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964) para metacromasia, secas à temperatura ambiente e montadas em resina sintética (Permount). O estudo da venação e das células epidérmicas, foi realizado a partir de técnicas de diafanização, utilizando-se hidróxido de sódio 10% por duas horas e hipoclorito de sódio 20% até clarificação completa, intercalados por lavagens em água corrente. Para coloração utilizou-se safranina 1% em etanol 50%, seguida de desidratação em série etanólica/xilólica crescente e montagem em verniz vitral (Acrilex[®]). A técnica de dissociação de epiderme foi aplicada para complementar a análise do tecido epidérmico, utilizando-se a solução de Jeffrey (Johansen 1940), violeta cristal 1% aquoso ou safranina 1% em etanol 50% como coloração e montagem em água glicerinada 1:1 (v/v). Os cristais foram detectados pela birrefringência sob luz polarizada. Para a maceração da casca, pequenos fragmentos foram colocados em tubos de ensaio com peróxido de oxigênio 30% e ácido acético glacial 1:1 (v/v), em estufa a 60°C durante 24-48h. Posteriormente, o material foi lavado em água corrente, corado com azul de astra aquoso 1% (Roeser 1972) e montado em água glicerinada 1:1 (v/v).

Para os testes histoquímicos, amostras frescas da região medial do limbo, assim como amostras de cascas previamente congeladas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa. As seções foram submetidas a diferentes corantes e reagentes: sudan vermelho escarlata (Brundrett et al. 1991) e sudan black B (Pearse 1980) para

lipídios totais; sulfato azul do Nilo (Cain 1947) para lipídios ácidos e neutros; reagente de Nadi (David e Carde 1964) para óleos essenciais e oleorresinas; tricloreto de antimônio (Hardman e Sofowora 1972, Mace et al. 1974) para esteróides; ácido sulfúrico (Geissman e Griffin 1971) para lactonas sesquiterpênicas; 2,4-dinitrofenilhidrazina (Ganter e Jollés 1969) para terpenóides com grupo carbonilo; cloreto de ferro III (Johansen 1940) e dicromato de potássio (Gabe 1968) para compostos fenólicos; vanilina clorídrica (Mace e Howell 1974) para taninos; floroglucina (Jensen 1962) para ligninas; reagente de Wagner (Furr e Mahlberg 1981) e reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg 1981) para alcalóides; ácido periódico/reagente de Schiff (Maia 1979) para polissacarídeos neutros; reagente de Lugol (Johansen 1940) para amido; vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para substâncias pécticas e xylidine ponceau (Vidal 1970) para proteínas. Secções de material incluído em metacrilato também foram utilizadas nos testes histoquímicos para amido, polissacarídeos neutros, substâncias pécticas e proteínas.

O estudo de microscopia de luz e a obtenção das imagens foram feitos em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Para determinação do grau de xeromorfismo ou mesomorfismo realizou-se a análise micromorfométrica do limbo baseando-se nos dados apresentados por Boeger et al. (2004) para espécies de Floresta Atlântica. As medições foram feitas a partir da região medial da lâmina foliar. Foram capturadas oito imagens ao acaso da região intervenal, onde se procederam três medições de cada parâmetro em software Image-Pro Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics Silver Spring, MD, USA). Quando presente, a camada subepidérmica foi mensurada junto com a epiderme da face adaxial. Os resultados das biometrias são apresentados da seguinte forma: (valor mínimo) - média - (valor máximo) \pm desvio padrão.

Para determinação da coloração externa e interna da casca do caule utilizou-se escala de cor Munsell Soil Color Charts.

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica, folhas e cascas, fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940), foram subdivididas em amostras de 0,25cm². Posteriormente, foram desidratadas em série etanólica crescente e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂, utilizando-se equipamento apropriado (modelo CPD 020, Bal-Tec). Após a montagem das amostras nos suportes metálicos com fita dupla-face, realizou-se a deposição metálica com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec). A análise e a captura de imagens foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss), do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Resultados

Folha

Morfologia e padrão de venação

Bathysa cuspidata (St. Hil.) Hook. f. possui folhas adultas de formato obovado a elíptico, ápice cuspidado, base cuneiforme, cerca de 50 cm de comprimento e 30 cm de largura, discolores, macias ao toque, com nervuras verde-claras impressas na face adaxial e proeminentes na face abaxial (Figura 1A-C). O padrão de venação é do tipo camptódromo-broquidódromo, com nervura de primeira ordem reta não ramificada. As nervuras de segunda ordem possuem ângulo de divergência agudo moderado no ápice (45-65°), agudo moderado a reto no meio [65-95°(100°)] e agudo amplo na base (65-80°). Essas se curvam levemente para cima até as proximidades da margem, onde sofrem curvatura abrupta formando um ângulo reto, no ponto de inserção com as nervuras de segunda ordem supra-adjacentes (Figura 1A). Nesse ponto, arcos menores formados por nervuras de terceira e quarta ordem vão se formando até atingirem a margem (Figura 1E). As nervuras intersecundárias se projetam muito pouco na região intercostal, bifurcando-se para se unirem com as nervuras de terceira e segunda ordem (Figura 1D). As nervuras de terceira ordem são percurrentes, simples, furcadas, retas ou sinuosas. As nervuras de quarta e quinta ordem apresentam padrão de ramificação aleatório com areolação imperfeita (figura 1D,E).

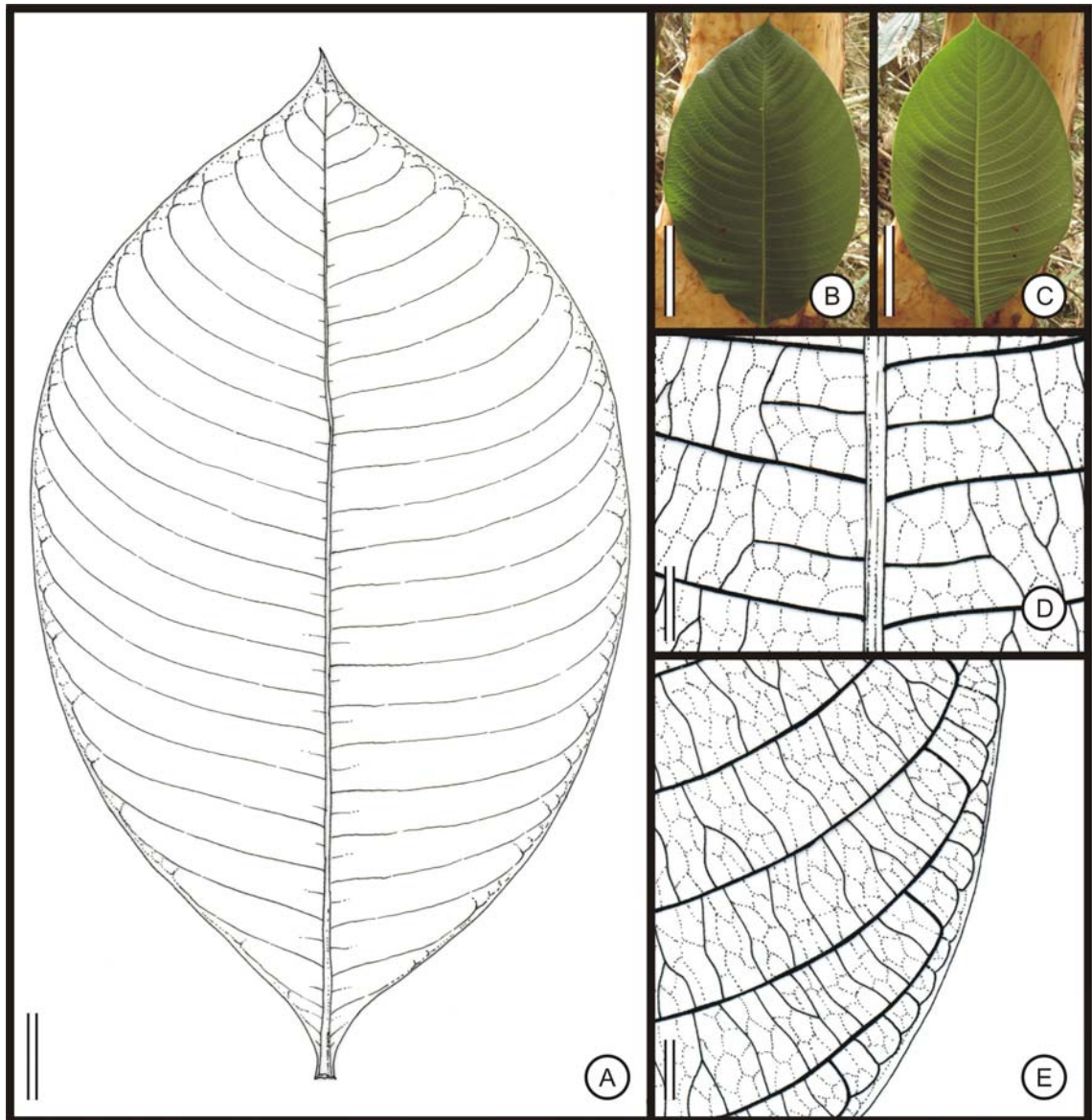


Figura 1A-D. Morfologia e venação foliar de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Padrão de venação camptódromo-broquidódromo. B. Face adaxial. C. Face abaxial. D. Detalhe da região da nervura principal. E. Detalhe da margem. Barra: A = 4 cm; B e C = 15 cm; D e E = 1 cm.

Limbo

A superfície foliar apresenta cutícula lisa nas duas faces da folha (Figura 2A,B,E). As células epidérmicas comuns, em vista frontal, são poligonais de paredes anticliniais retas a levemente sinuosas em ambas as faces (Figura 2C-D). Os estômatos são do tipo paracítico ou paralelocítico, restritos apenas à face abaxial (Figura 2D,E). Tricomas do tipo tector, pluricelulares (4-8 células), unisseriados, lignificados e com parede celular rugosa (Figuras 2B,C,G,H; 3D) estão presentes em ambas as faces, apresentando maior densidade na face abaxial (Figura 2F). A base do tricoma apresenta-se rodeada por 7-13 células comuns dispostas radialmente à maneira de uma roseta (Figura 2A-C). Em vista transversal, a face adaxial apresenta cutícula delgada que recobre células epidérmicas de paredes espessadas, com formato arredondado a retangular nas regiões intervenais e menores com formato arredondado ou alongado verticalmente nas regiões das nervuras (Figura 3A,C,F). Na face abaxial as células epidérmicas possuem formato semelhante às da face adaxial, ainda que menos volumosas (ver tabela 1) e algumas sejam tabulares (Figura 3E). Os estômatos estão no mesmo nível ou acima das demais células epidérmicas. Apresentam células guardas com cristas que guarnecem o ostíolo, formando uma câmara epiestomática (Figura 3B). A base do tricoma é provida de pontoações e se projeta por entre as células do mesofilo (Figura 3E).

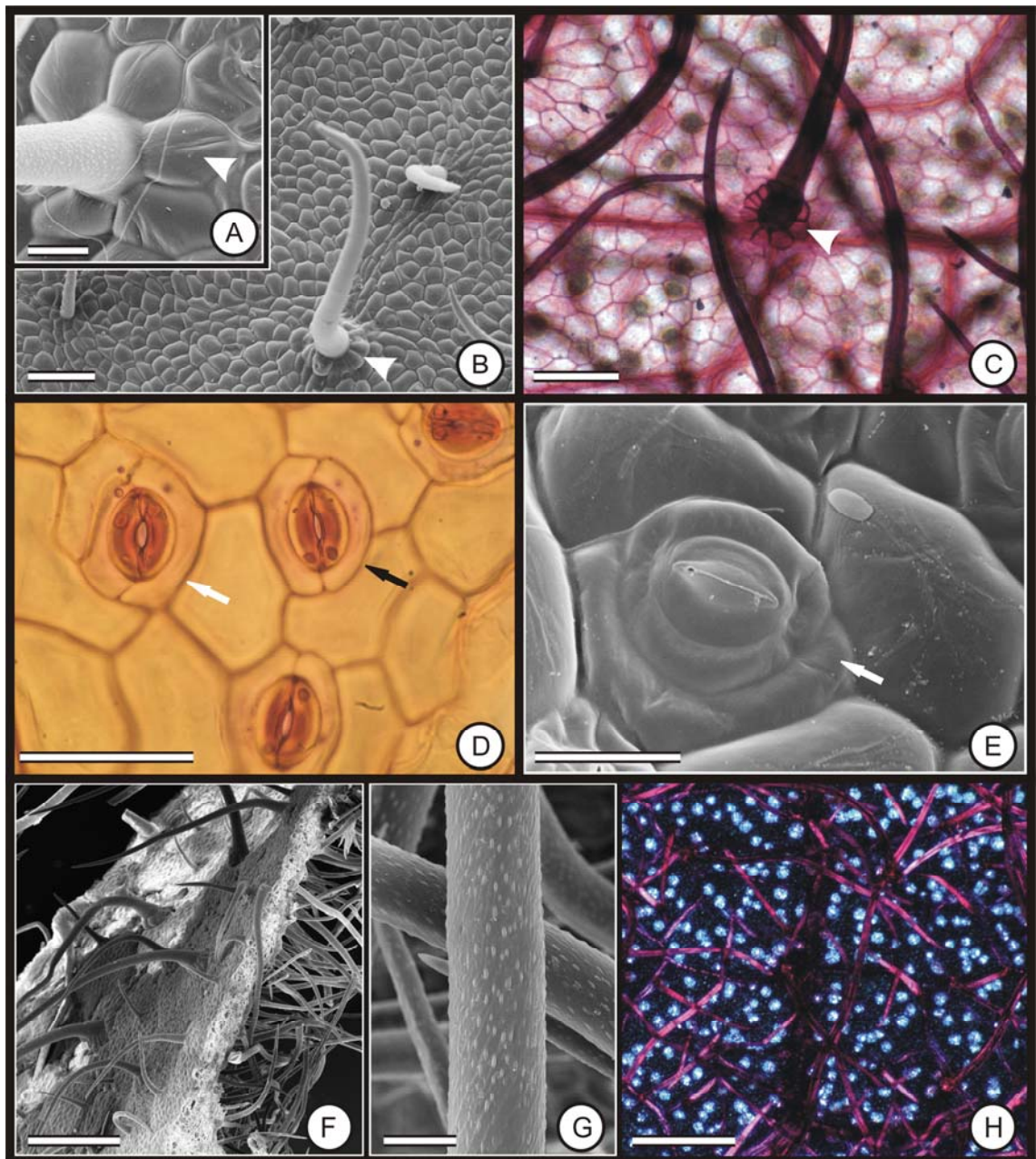


Figura 2A-F. Superfície foliar de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A-C. Face adaxial, com tricomas tectores cujas células da base se dispõem em roseta (cabeça de seta). D e E. Face abaxial com estômatos paracíticos (seta preta) e paralelocíticos (seta branca). F. Aspecto geral da distribuição e densidade de tricomas no limbo. G. Detalhe da ornamentação dos tricomas. H. Birrefringência dos tricomas e dos idioblastos cristalíferos presentes no mesofilo. Barra: A, E e G = 20 μm ; B e C = 100 μm ; D = 50 μm ; F e H = 300 μm .

O mesofilo é heterogêneo do tipo dorsiventral, com 1-3 camadas de células subepidérmicas aclorofiladas com paredes espessadas, em geral restritas à face adaxial nas nervuras. O parênquima paliçádico é frouxo, unisseriado, formado por células longas (Figura 3A). O parênquima lacunoso possui cerca de 5 camadas de células de formato variado, com tendência a braciiforme, distribuídas de modo espaçado e irregular, formando anastomoses, conferindo um aspecto miceliforme ao tecido (Figura 3A,H). Idioblastos cristalíferos contendo areia cristalina podem se apresentar isolados ou aos pares ao longo do parênquima lacunoso ou na interface dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figuras 2H; 3A,G,H).

O bordo é revoluto, tendo o feixe vascular mais distal, provido de extensão de bainha, como o ponto que caracteriza seu início. A partir desse ponto em direção à margem, o parênquima paliçádico possui células menos alongadas e o parênquima lacunoso espaços intercelulares menores. Na região mais distal do bordo, próximo à margem, o mesofilo tem aspecto homogêneo, caracterizado por células parenquimáticas de formato arredondado, parede espessada e tamanho variado, sendo as mais externas maiores. Nessa região podem ocorrer feixes vasculares de pequeno calibre, estômatos e tricomas (Figura 3C).

O sistema vascular do limbo é formado por feixes colaterais, mas difere em grau de complexidade de acordo com a magnitude da nervura. A nervura principal tem contorno plano-convexo, na base e convexo-convexo, no meio e ápice, sendo mais proeminente na face abaxial (Figura 4A). As células epidérmicas são arredondadas, pouco volumosas, recobertas por cutícula delgada. Ocorre colênquima do tipo angular variando de 3-8 camadas de células, dependendo da porção amostrada (Figura 4B). As células parenquimáticas da região cortical e medular são arredondadas, com vários idioblastos contendo areia cristalina (Figura 4C-F). O sistema vascular é formado por duas séries de feixes: uma mais externa, formando um cilindro que pode ser contínuo ou apresentar pequenas discontinuidades preenchidas por parênquima, e uma mais interna, formada por feixes medulares livres, sendo um deles central (Figura 4A,C,D,F). Feixes acessórios menores, em número variável, são encontrados na porção adaxial do córtex (Figura 4A,E). Fibras perivasculares guarnecem o floema (Figura 4D). O feixe central da região medial da nervura principal apresenta as margens fletidas para o centro e uma rotação de até 60° no seu eixo quando comparado com as porções basal e apical (Figura 4A,D).

As nervuras de segunda ordem apresentam padrão semelhante ao encontrado na nervura principal, exceto pelo seu sistema vascular que é constituído de apenas um feixe vascular central levemente arqueado. As nervuras de ordem superior estão envoltas por uma bainha parenquimática lignificada, que pode se estender até uma ou ambas as faces, comunicando os feixes vasculares a uma camada subepidérmica, restrita a essa região do limbo. As células da extensão de bainha também são lignificadas, porém com lúmen reduzido e parede mais espessa, sendo as da face adaxial formadas por 1-3 fileiras de células (Figura 3A,C,E,F).

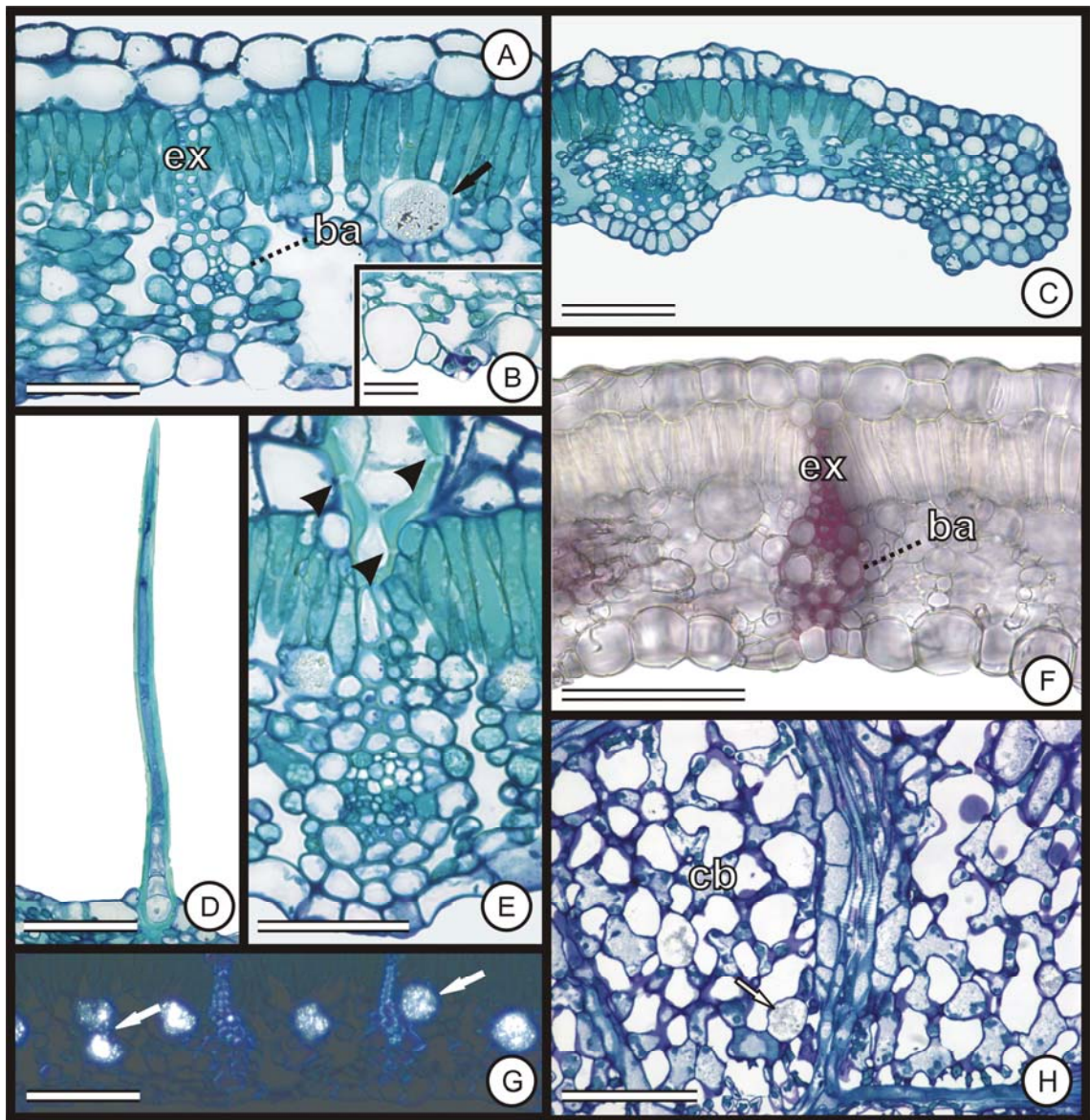


Figura 3A-H. Secções transversais (A-G) e paradérmica (H) da região intervenal e do bordo de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Limbo com estômato em detalhe (B). C. Bordo foliar. D. Tricoma tector. E. Nervura, com base do tricoma provida de pontuações (cabeça de seta). F. Reação positiva da floroglucina para detecção de lignina, onde a bainha e sua extensão coraram-se de vermelho. G. Birrefringência dos idioblastos cristalíferos. H. Detalhe do parênquima lacunoso, com aspecto miceliforme conferido por células braciformes (cb). Bainha do feixe (ba); extensão de bainha (ex); idioblasto cristalífero (seta). Barra: A, C-H = 100 μ m; B = 30 μ m.

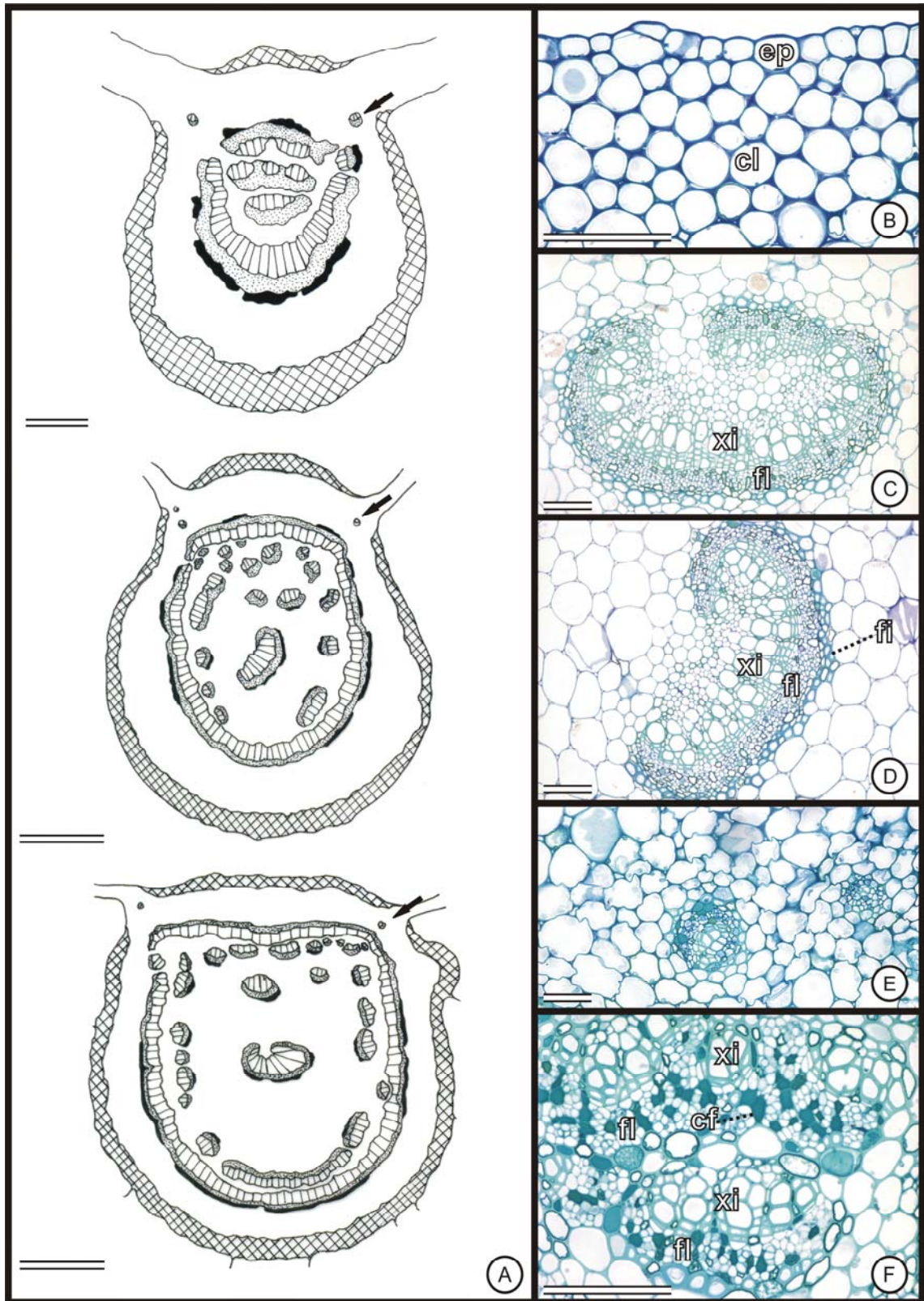


Figura 4A-F. Secções transversais da nervura principal do limbo de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. De cima para baixo, regiões apical, medial e basal, mostrando os feixes acessórios (seta). B. Epiderme (ep) e colênquima do tipo angular (cl). C. Feixe medular central da região basal. D. Feixe medular central da região medial. E. Detalhe dos feixes acessórios. F. Sistema vascular da região apical, com células de conteúdo fenólico (cf). Fibras (fi); floema (fl); xilema (xi). Barra: A = 250 µm; B-F = 100 µm.

Tabela 1: Análise quantitativa do limbo de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f.

| Tecido | Espessura em μm | Proporção em % |
|------------------------|--|-----------------------|
| Epiderme, face adaxial | (23.4)- 31.1 -(39.8) \pm 6.2 | 18 |
| Parênquima paliçádico | (48.7)- 53.5 -(55.7) \pm 2.8 | 31 |
| Parênquima lacunoso | (54.3)- 72.3 -(89.5) \pm 15.2 | 42 |
| Epiderme, face abaxial | (12.7)- 15.7 -(20.0) \pm 2.4 | 9 |
| Limbo | (141.3)- 172.6 -(199.7) \pm 22.3 | 100 |

Pecíolo

O pecíolo possui contorno plano-convexo, independente da porção amostrada (Figura 5A). A epiderme é unisseriada com células arredondadas, pouco volumosas e cutícula delgada. O tecido de sustentação é formado por colênquima do tipo angular variando de 5-15 camadas contínuas (Figura 5A,B). As regiões cortical e medular são constituídas de células parenquimáticas isodiamétricas organizadas de modo a formar espaços vazios dando um aspecto aerenquimatoso ao tecido (Figura 5C). O sistema vascular segue o padrão descrito para nervura principal, porém o feixe central das regiões medial e apical tem ângulo de rotação menor, com cerca de 30° (Figura 5A,D). Feixes acessórios circulares, em número de 4-5, podem ser encontrados no córtex formando uma linha em direção a face adaxial (Figura 5A,E,F). Idioblastos contendo areia cristalina podem ser encontrados no córtex e na medula (Figura 5C,E,F).

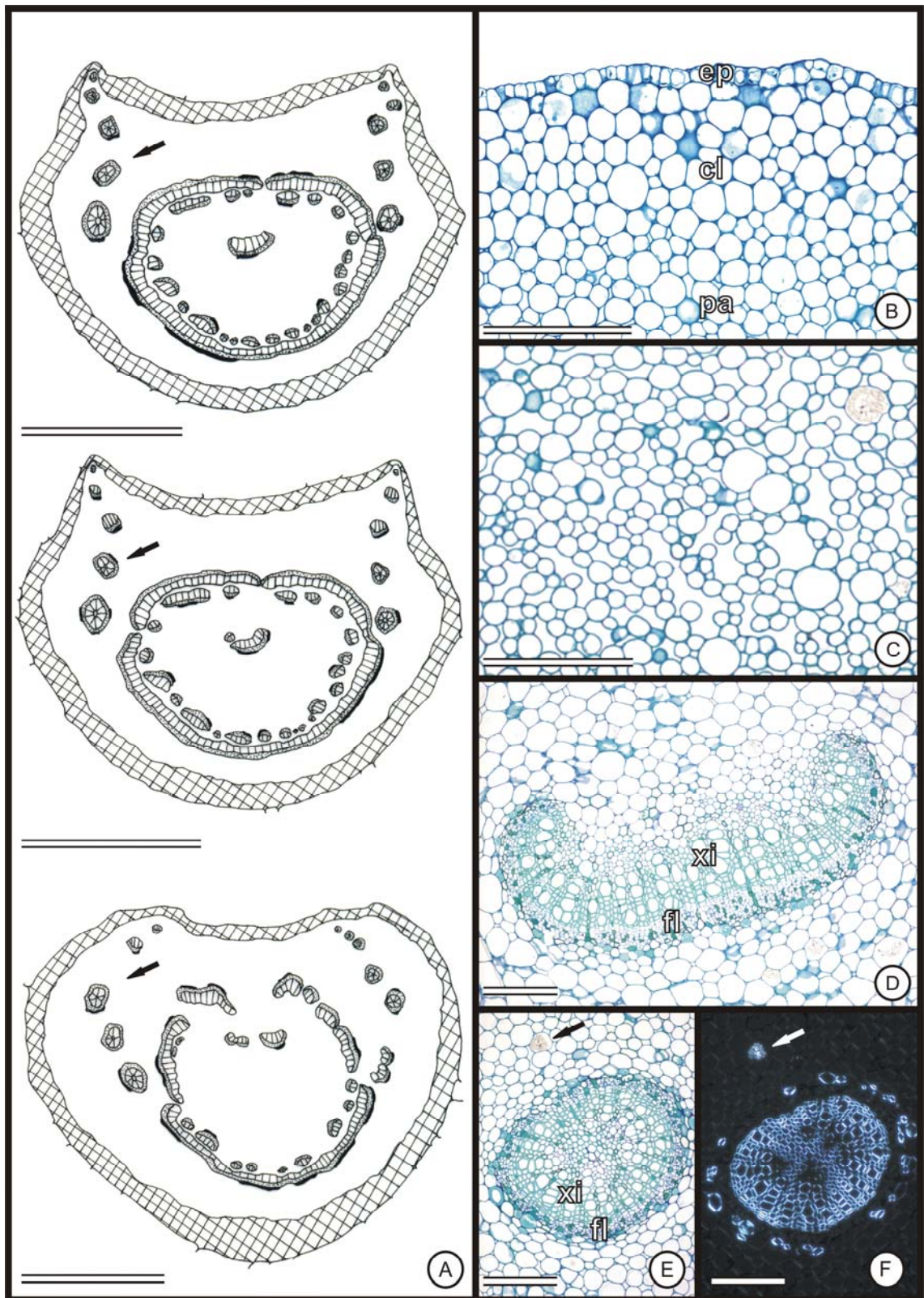


Figura 5A-F. Seções transversais do pecíolo de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. De cima para baixo, regiões apical, medial e basal, mostrando os feixes acessórios (seta). B. Epiderme (ep), colênquima do tipo angular (cl) e parênquima (pa). C. Região do córtex, com aspecto aerenquimatoso. D. Feixe medular central da região apical. E. Feixe cortical acessório, com idioblasto cristalífero (seta). F. Equivalente à E sob luz polarizada. Xilema (xi); floema (fl). Barra: A = 3 mm; B-F = 200 μ m.

Histoquímica da folha

O limbo quando não submetido aos reagentes possui as células da epiderme translúcidas e os parênquimas paliçádico e lacunoso com células esverdeadas devido à presença de clorofila (Figura 6A). Dos testes histoquímicos aplicados nas folhas de *Bathysa cuspidata* (ver tabela 2), ocorreram reações positivas apenas para compostos fenólicos. As células epidérmicas da face adaxial e do parênquima paliçádico coram de castanho quando submetidas ao dicromato de potássio, sendo essa a reação positiva para conteúdo fenólico (Figura 6B-C). O floema nas nervuras e no pecíolo encontra-se entremeado com células de conteúdo fenólico, evidenciadas pelo cloreto férrico (Figura 6D), dicromato de potássio e formalina em sulfato ferroso.

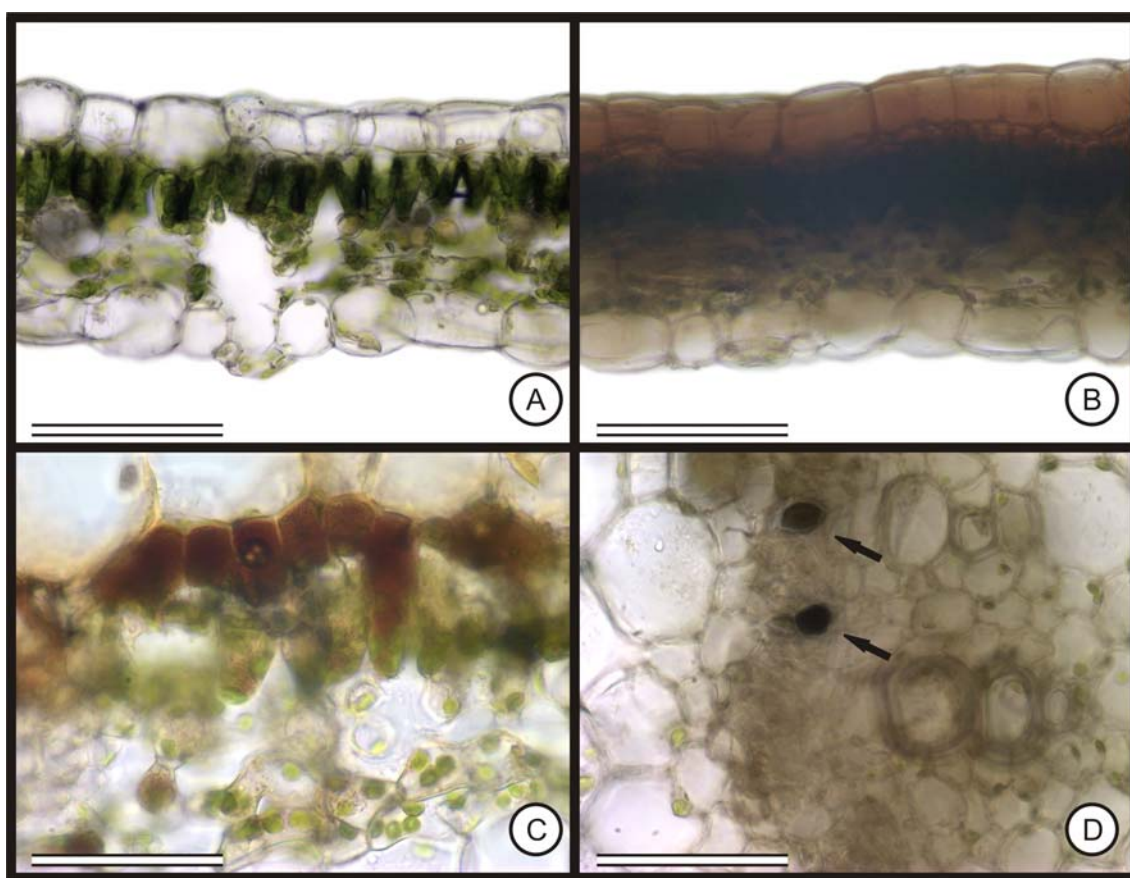


Figura 6A-D. Histoquímica da folha de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Limbo não submetido aos reagentes. B-D. Limbo com reação positiva para compostos fenólicos. B. Epiderme da face adaxial corada de castanho escuro pelo dicromato de potássio. C. Células parenquimáticas coradas de castanho escuro pelo dicromato de potássio. D. Células do floema na nervura principal coradas de negro pelo cloreto férrico (seta). Barra: A e B = 100 μm ; C e D = 50 μm .

Casca do caule

Características gerais

A casca do caule tem cheiro herbóreo. Externamente, é estriada, de cor cinza escuro avermelhado, recoberta por líquens e briófitas. Internamente é lisa, de cor rosa (Figura 7A-B). Quando exposta ao ambiente oxida-se rapidamente adquirindo uma coloração avermelhada internamente.

Anatomia

Casca composta por floema secundário, região cortical e ritidoma persistente, constituído de 3-4 peridermes, bem desenvolvidas, conferindo aspecto ondulado à casca (Figura 7C). *Periderme*: súber formado por 5-10 camadas de células, sendo a feloderme pouco desenvolvida com 1 a 2 camadas de células, muitas vezes indistintas do felogênio (Figura 7C,D). Células parenquimáticas com conteúdo fenólico e mais raramente esclereídes podem ser encontradas na periderme (Figura 7D). *Córtex*: formado por células parenquimáticas, de parede primária delgada, alongadas no sentido tangencial, geralmente com conteúdo fenólico (Figura 7E). Vários esclereídes de diferentes formatos estão distribuídos isoladamente ou formando agrupamentos nessa região (Figura 7E-I). *Floema secundário*: não estratificado, sistema axial organizado em cones formados por elementos condutores guarnecidos por esclereídes e células esclerificadas (Figura 8A). As células esclerificadas se diferenciam próximo a região cambial, entremeadas com os elementos condutores do floema. (Figura 8B,F). *Elementos de tubo crivado*: possuem placa crivada simples, oblíqua e áreas crivadas laterais (Figura 8D,E). Estão isolados ou em grupos de dois ou mais, em geral associados a uma célula companheira, porém podem apresentar mais de uma ou dois elementos de tubo crivado vizinhos compartilharem a mesma célula companheira (Figura 8C). *Parênquima axial*: células geralmente com conteúdo fenólico, de parede primária delgada, formato arredondado e distribuição difusa (Figura 8C). *Raio*: heterocelulares, multisseriados, com 2-12 células de largura. Apresentam percurso retilíneo, sofrendo dilatação à medida que se distanciam do câmbio (Figura 8A-B, 9A-D). É comum a presença de grãos de amido e areia cristalina nas células de parênquima, seja no córtex, parênquima axial ou radial.

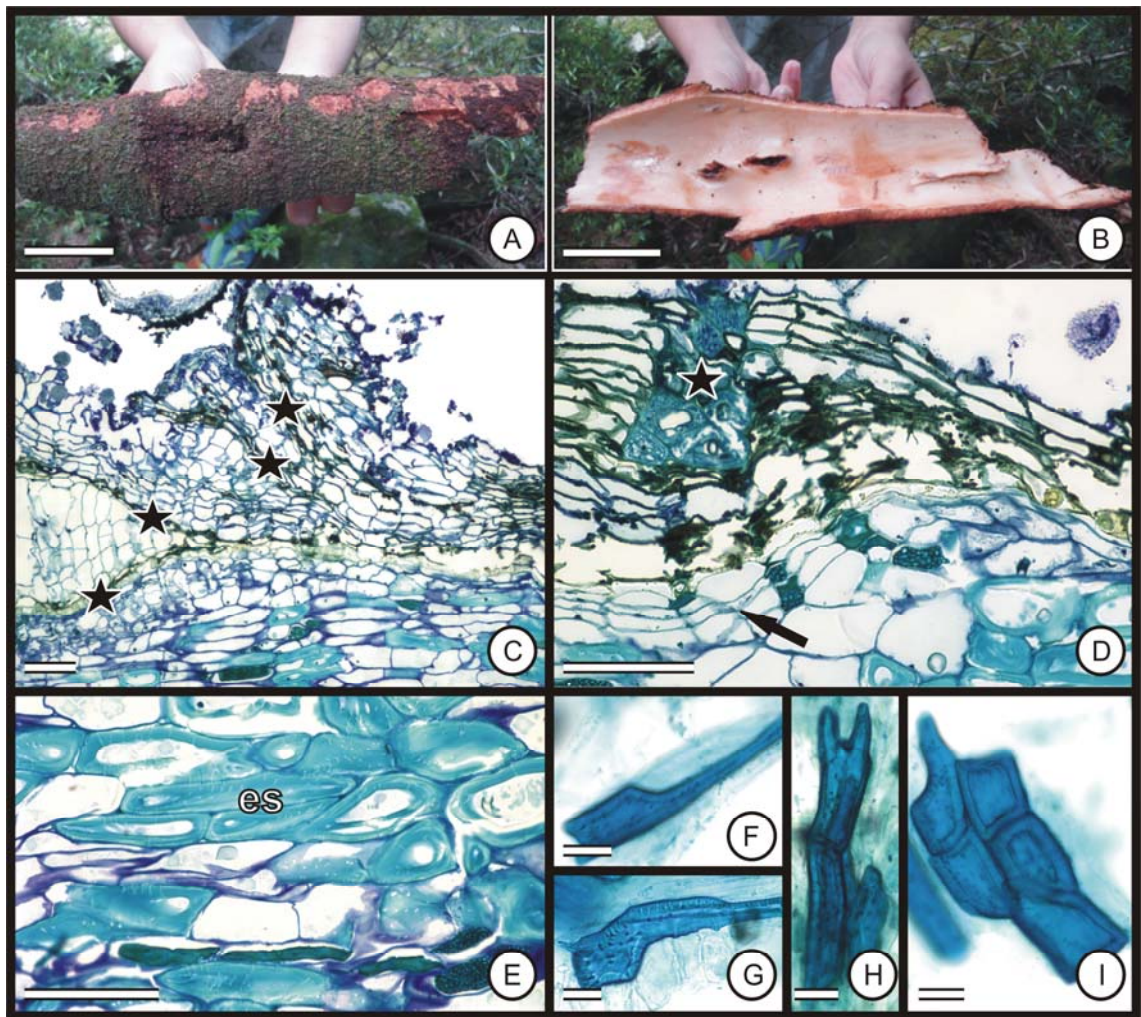


Figura 7A-I. Aspecto geral (A e B), seções transversais (C-E) e macerado (F-I) da casca do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Região externa da casca. B. Região interna da casca. C. Ritidoma com sucessivos felogênios (★). D. Detalhe de C, mostrando o felogênio (seta) e as células esclerificadas no súber (★). E. Esclereídes (es). F-I. Variação no formato dos esclereídes. Barra: A e B = 6 cm; C-E = 100 μ m, F-I = 50 μ m.

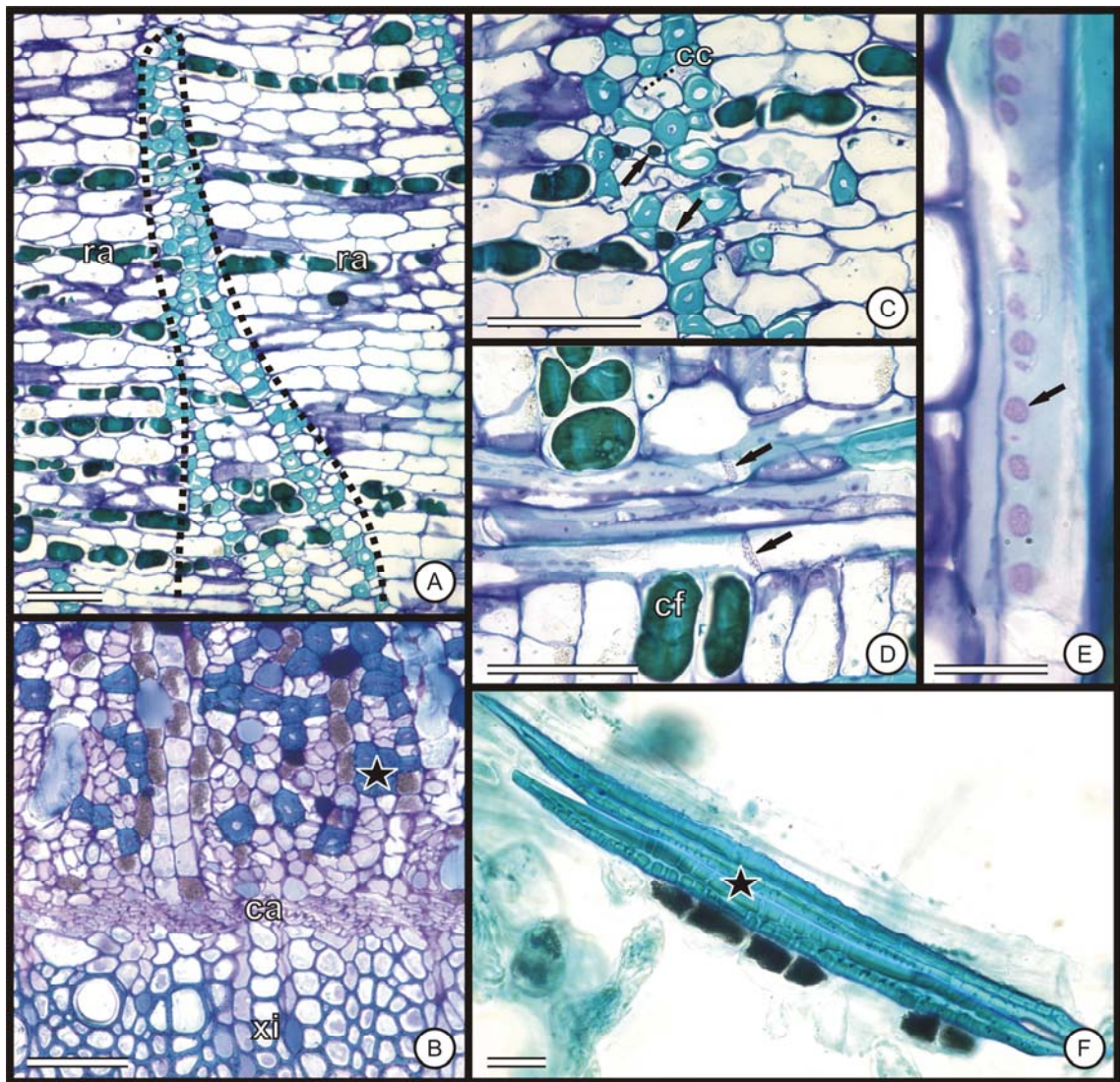


Figura 8A-J. Secções transversais (A-C), longitudinais tangenciais (D-E) e macerado (F) da casca do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Floema secundário em forma de cone (pontilhado). B. Região cambial com células esclerificadas (★). C. Detalhe do floema secundário, mostrando o parênquima axial (seta) e células companheiras (cc). D. Elemento de tubo crivado, mostrando as placas crivadas (seta). E. Elemento de tubo crivado com áreas crivadas laterais (seta). F. Células esclerificadas isoladas. Câmbio (ca); células com conteúdo fenólico (cf); xilema (xi). Barra: A-D = 100 µm; E = 25 µm; F = 50 µm.

Histoquímica da casca

A casca do caule quando não submetida a nenhum reagente possui células em geral translúcidas, raramente apresentando coloração alaranjada (Figura 9A). Dos testes histoquímicos aplicados na casca do caule *Bathysa cuspidata* (ver tabela 2), ocorreram reações positivas para compostos fenólicos e taninos. Esses compostos estão presentes principalmente no parênquima axial, radial e cortical (Figura 9B-D).

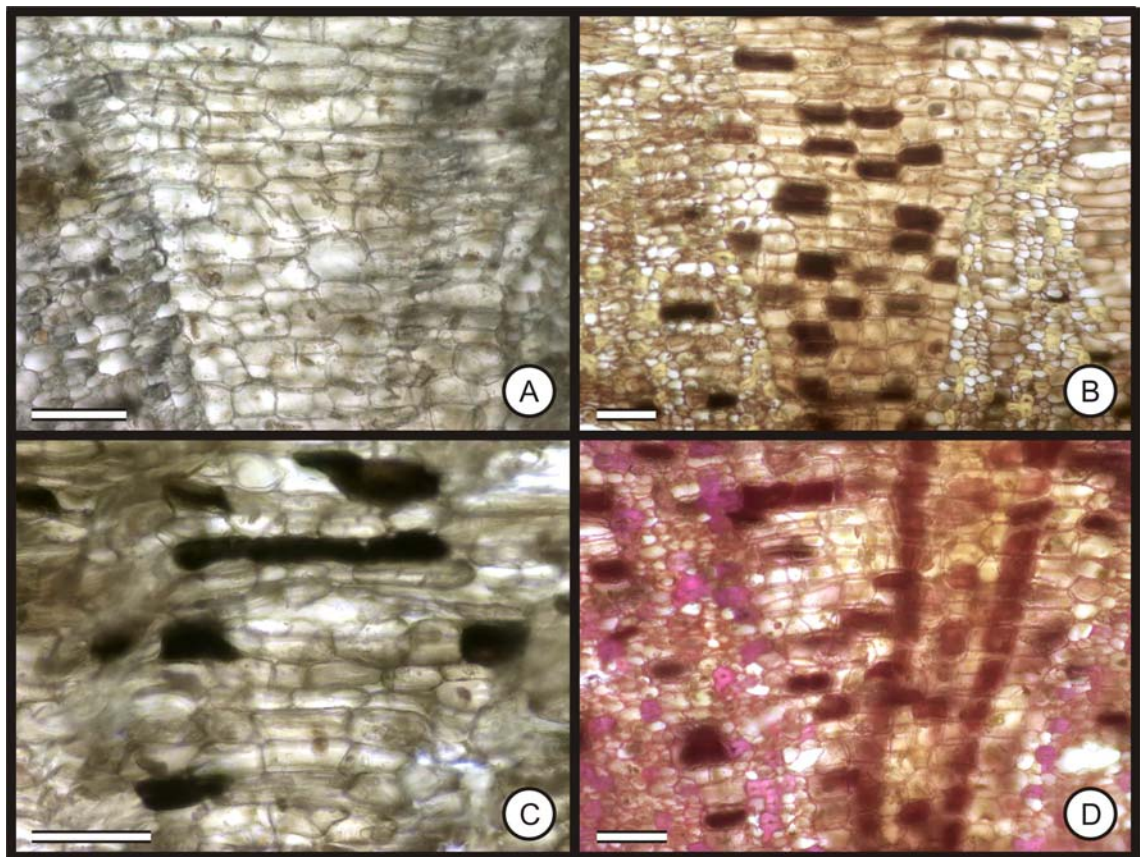


Figura 9A-D. Secções transversais da casca do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Casca não submetida aos reagentes. B-C. Reação positiva para compostos fenólicos. B. Células parenquimáticas do floema coradas de castanho escuro pelo dicromato de potássio. C. Células parenquimáticas do floema coradas de negro pelo cloreto férrico. D. Células parenquimáticas do floema com taninos corados de vermelho pela vanilina clorídrica. Barra: A-D = 100 μ m.

Tabela 2: Dados comparativos da histoquímica da folha e casca do caule de *Bathysa cuspidata*. (+) presença; (-) ausência.

| Grupo de compostos | Reagente/corante | Folha | Casca |
|---------------------------|---|--------------|--------------|
| Lipídios | Sudan escarlate | - | - |
| | Sudan black B | - | - |
| | Sulfato de azul do Nilo | - | - |
| Terpenóides | Reagente de Nadi | - | - |
| | Tricloreto de antimônio | - | - |
| | Ácido sulfúrico | - | - |
| | 2,4-dinitrofenilhidrazina | - | - |
| Compostos fenólicos | Cloreto de ferro III | + | + |
| | Dicromato de potássio | + | + |
| | Formalina em sulfato ferroso | + | + |
| | Vanilina clorídrica | - | + |
| | Floroglucina | + | + |
| Alcalóides | Reagente de Wagner | - | - |
| | Reagente de Dittmar | - | - |
| Carboidratos | Ácido periódico/ reagente de Schiff (PAS) | - | - |
| | Reagente de Lugol | - | + |
| | Vermelho de Rutênio | - | - |
| Proteínas | Xylidine Ponceau (XP) | - | - |

Discussão

A presença de cutícula lisa, epiderme de paredes retas e tricomas providos de ornamentações verrucosas, foram encontrados em outras espécies de Rubiaceae, tal como apresentado por Salatino et al. (1986), Nascimento et al. (1996) e Oliveira et al. (2003) para micromorfologia foliar de *Tocoyena formosa*, *B. stipulata* e *Melanopsidium nigrum*, respectivamente.

A região medial da nervura principal, em *B. cuspidata*, possui o feixe medular central com as margens fletidas para o centro e rotação conspícua em seu eixo. Gomes et al. (2000), em seu estudo com quatro espécies do gênero, dentre elas *B. cuspidata*, não faz menção a essa característica do feixe medular central da nervura principal nas espécies estudadas. Sugere-se aqui, que esse seja o caráter anatômico mais consistente para identificação de *B. cuspidata*, a partir de material estéril ou até mesmo fragmentos de folhas, visto que as outras espécies do gênero (Nascimento et al. 1996, Gomes et al. 2000), bem como mais de 30 espécies de Rubiaceae consultadas na literatura não apresentam essa característica (Vieira 1986, 1986/88, Da Cunha e Vieira 1993/97, Vieira et al. 1992, Nunes et al. 1994, Tavares e Vieira, 1994, Gomes et al. 1995, Nascimento et al. 1996, Assis e Giulietti 1999, Pereira et al. 2003, Alves et al. 2004,

Gattuso et al. 2004, Kocsis et al., 2004, Coelho et al. 2006). Os feixes vasculares podem ou não apresentar fibras guarnecendo o floema, dependendo do estágio de desenvolvimento da folha. O xilema de alguns feixes da série interna, quando bem desenvolvido, chega a se unir com o xilema dos feixes da série externa, dando a falsa impressão de um feixe bicolateral.

Nas folhas de *B. cuspidata* não foram encontrados esclereídes, sendo o papel de suporte mecânico desempenhado pelo colênquima, fibras e sistema vascular. Verificou-se também que o parênquima lacunoso do limbo e o parênquima fundamental da nervura principal e do pecíolo possuem grandes espaços intercelulares a maneira de um aerênquima. As folhas de *B. cuspidata* são muito grandes (cerca de 1 metro de comprimento) e se concentram nas extremidades dos ramos. Tal fato pode estar relacionado com esse aspecto aerenquimatoso dos parênquimas, que possivelmente contribui para diminuir o peso específico das folhas, como observado por Pereira et al. (2003) para *Palicourea longepedunculata* (Rubiaceae).

De modo geral, o estudo anatômico de *B. cuspidata* revelou que folhas hipoestomáticas, epiderme com células de paredes retas, estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral e sistema vascular colateral refletem as características da família Rubiaceae, citadas por Solereder (1908), Accorsi (1947) e Metcalfe e Chalk (1950). Entretanto, várias características observadas nas folhas podem estar associadas com as condições ambientais em que essas plantas vivem.

Germano-Filho (1999) classifica o indumento de *B. cuspidata* como velutino, caracterizado por Rizzini (1977) como de pilosidade densa, ereto, recordando sensação de veludo. Essa grande densidade de tricomas pode ser interpretada como um mecanismo de defesa ou resistência a predadores, parasitas ou patógenos. Entretanto, essa grande densidade de tricomas aumentaria muito a superfície de contato da folha com o ambiente, propiciando grande perda de água (Johnson 1975). O local de estudo possui alta pluviosidade e baixa disponibilidade de luz, o que favoreceria uma menor perda de água por transpiração. Contudo, em *B. cuspidata*, a menor perda de água por transpiração pode estar sendo influenciada pela lignificação encontrada nas paredes celulares dos tricomas.

A ocorrência de ápice acuminado relaciona-se com as folhas de plantas que habitam o subosque, onde há um elevado grau de umidade (Roth 1984, Turner 2001), como na Floresta Ombrófila Densa. Este ápice tem a função de drenar a água da superfície foliar acelerando a secagem da folha e conseqüentemente evitando o

estabelecimento de organismos epífilos (Dean e Smith 1978, Pyykkö 1979, Roth 1984, Turner 2001).

Coutinho (1962) relata que folhas hipoestomáticas são usuais em Florestas Tropicais, ressaltando que tal característica pode contribuir para proteção contra a obliteração das fendas estomáticas pela flora epifítica (e.g. fungos, musgos, hepáticas), que constantemente recobre a face adaxial de espécies florestais. Em campo pôde-se perceber que uma grande quantidade de fungos recobre a face adaxial de muitas folhas de *B. cuspidata*, constatação também relatada para *B. stipulata* por Nascimento et al. (1996).

Folhas que se desenvolvem em ambientes com menor disponibilidade de luz, como os subosques de florestas ombrófilas, tendem a apresentar características morfológicas como maiores áreas foliares e menor espessura da lâmina foliar e estas características são interpretadas como estratégias para maior captação de luz difusa que se propaga no interior das formações florestais (Givnish 1988). O mesófilo de *B. cuspidata* apresenta características semelhantes às apontadas para plantas de sombra por Taiz e Zeiger (2004). Os dados quantitativos do limbo de *B. cuspidata* estão de acordo com os apresentados por Boeger et al. (2004) para espécies com características mesomórficas de Floresta Atlântica (ver tabela 1).

O estudo anatômico da casca do caule de *B. cuspidata* revelou que periderme com ritidoma e feloderme pouco desenvolvida, raios heterocelulares, multisseriados, elementos de tubo crivado com placas crivadas simples, obliquas, presença de areia cristalina e grãos de amido estão de acordo com as observações de Gattuso et al. (2004) para as cascas de *Uncaria* (Rubiaceae).

É comum a presença de esclerênquima no floema secundário de *B. cuspidata*. Algumas células desse tecido são alongadas como uma fibra, porém, diferem das fibras por serem curtas com lume reduzido, paredes muito espessadas formando lamelas concêntricas, providas de pontoações conspícuas, simples e ramificadas. Estas células esclerificadas não se encaixam em nenhuma das definições de fibras nem esclereídes de acordo com Evert (2006). Este tipo de célula já foi descrito no floema secundário de *Styrax camporum* como células esclerificadas (Machado et al. 2005). O mesmo termo foi usado para estrutura similar encontrada na casca do caule de *Buchenavia* e *Terminalia* (Combretaceae) (Angyalossy-Alfonso e Richter 1991) e *Delarbrea paradoxa* (Araliaceae) (Kolalite et al. 2003).

Segundo Machado et al. (2005), as células esclerificadas se diferenciam próximo ao câmbio no floema condutor, sendo a principal diferença entre as células

esclerificadas e os esclereídes relacionada ao período em que são formados. Esses mesmos autores ressaltaram que as células esclerificadas estão completamente diferenciadas próximo ao câmbio enquanto os esclereídes se desenvolvem nas zonas de dilatação tendo origem nas células de parênquima já diferenciadas, portanto, têm origem secundária. As células esclerificadas encontradas em *B. cuspidata* são semelhantes às células esclerificadas de *Styrax camporum* descritas por Machado et al. (2005).

O floema de *B. cuspidata* é caracterizado por possuir sistema axial formando cones alternados com os raios. Segundo Evert (2006), só uma pequena faixa junto ao cambio é constituída de floema condutor. A porção condutora do floema consiste de elementos de tubo crivado ativos, por onde há o transporte de fotoassimilados, hormônios, substâncias sinalizadoras, entre outras (Van Bel 2003). No floema não condutor, como a terminologia já diz, não há mais transporte devido à perda da função de seus elementos de tubo crivado. Tal classificação segue a proposta de Evert (2006), que questiona o uso dos termos “floema não colapsado” e “floema colapsado” adotado como sinônimo de floema condutor e não condutor, visto que os termos colapsado e não colapsado se referem somente aos elementos condutores, não levando em consideração a existência das células parenquimáticas axiais, íntegras e funcionais. Sabe-se ainda que a perda da condução ocorre anteriormente ao colapso do elemento de tubo crivado. Em *B. cuspidata* vários elementos de tubo crivado não colapsados, com placas crivadas íntegras, foram encontrados na região do cone, distante do cambio vascular, entretanto, não foi possível afirmar se esses elementos são condutores ou não.

Contudo, a dilatação dos raios assumindo configuração de cunha, que sofre fusão na região próxima ao início do córtex, tal como observado em *B. cuspidata* é apontada como um dos eventos concomitantes com o início da perda de função dos elementos condutores (Evert 2006). Esse processo de dilatação se dá por divisões anticlinais e alongamento das células no sentido tangencial. Evert (2006) relata que a dilatação dos raios ocorre para acomodação do aumento em circunferência do tronco, com aumento radial e tangencial das células parenquimáticas radiais e axiais, e até mesmo a divisão destas.

Não foram encontrados dados sobre a anatomia da casca do caule de espécies de *Bathysa*, sendo impossível fazer comparações com os resultados aqui apresentados. Entretanto, sugerem-se como características importantes para identificação da espécie a partir de cascas do caule: (i) aspecto externo e interno da casca; (ii) o padrão geral da periderme, em destaque a presença de ritidoma; (iii) presença de uma região cortical remanescente, com inúmeros esclereídes; (iv) sistema axial do floema secundário

formando cones, com elementos condutores guarnecidos por células esclerificadas e esclereides; e (v) presença de compostos fenólicos como taninos nas células parenquimáticas da região cortical e parênquimas do floema.

Em estudo com o extrato etanólico das folhas e casca, Nunes (2008) verificou através de cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD) que *Bathysa cuspidata* possui alcalóides, cumarinas, triterpenos, esteróides, flavonóides e taninos.

Apenas os metabólitos de natureza fenólica como taninos, foram detectados através da histoquímica em células parenquimáticas da casca de *B. cuspidata*. Nas folhas, apenas compostos fenólicos gerais foram observados na face adaxial da epiderme, no parênquima paliçádico e parênquima do floema na nervura principal e no pecíolo. Provavelmente os outros metabólitos reportados por Nunes (2008) e identificados a partir do extrato etanólico de *B. cuspidata* como alcalóides, cumarinas e terpenos, não tenham sido detectados pela histoquímica devido a restrições da técnica, pois segundo a mesma autora, esses tiveram rendimento menor que os metabólitos de natureza fenólica, sendo a CCD mais sensível na detecção de pequenas quantidades de substâncias.

A comercialização de *Bathysa cuspidata* não é feita através de extratos ou tinturas, e sim de material vegetal seco, estabilizado e rasurado, assim denominado de droga vegetal. Desta forma, torna-se possível a identificação da espécie a partir da própria droga vegetal, desde que haja informações para realização de tal procedimento. Apesar das características citadas acima serem marcantes para o reconhecimento da espécie, é prudente mencionar que o estudo tem abrangência regional e variações podem ser encontradas em indivíduos de regiões diferentes.

Conclusões

Os dados obtidos nesse estudo podem servir não só para procedimentos de identificação que garantem a utilização da matéria-prima apropriada, mas também para adequação aos padrões de controle de qualidade. O caráter anatômico mais consistente para identificação de *B. cuspidata* a partir de material estéril ou até mesmo fragmentos de folhas é a rotação conspícua do feixe medular central na região medial da nervura principal. Também são listadas algumas características relevantes para o reconhecimento da casca do caule. O estudo histoquímico demonstrou que existe semelhança entre os metabólitos de interesse encontrados nas folhas e na casca do caule, principalmente em relação aos compostos de natureza fenólica, o que torna a folha um potencial farmacógeno nessa espécie.

Referências Bibliográficas

- ACCORSI WR. 1947. Ocorrência das células anexas dos estômatos na família Rubiaceae. Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” 4: 421-436.
- ALVES RMS, STEHMANN JR, ISAÍAS RMS e BRANDÃO MGL 2004. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 14: 49-56.
- ANGYALOSSY-ALFONSO V e RICHTER HG. 1991. Wood and bark anatomy of *Buchenavia Eichl.* (Combretaceae). IAWA Bull. 12: 123-141.
- ASSIS MC e GIULIETTI AM. 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). Revta brasil. Bot. 22(2): 205-216.
- BOEGER MRT, ALVES LC e NEGRELLE RRB. 2004. Leaf Morphology of 89 Tree Species from a Lowland Tropical Rain Forest (Atlantic Forest) in South Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47(6): 933-943.
- BOTSARIS AS. 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 3: 18.
- BRUNDRETT MC, KENDRICK B e PETERSON CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. Biotechnic & Histochemistry 66:111-116.
- CAIN AJ. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88(3): 383-92.
- COELHO VPM, AGRA MF e BARBOSA MRV. 2006. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 16(2): 170–177.
- COUTINHO LM. 1962. Contribuição ao conhecimento da mata pluvial tropical. B. Fac. Fil. Cienc. Letr. USP Bot. 18: 1-229.
- CUNHA NS. 1937. Uma perícia farmacognóstica e falsas quininas do Brasil. Revista da associação brasileira de farmacêuticos RJ 18(4): 156-168.
- DA CUNHA M e VIEIRA RC. 1993/97. Anatomia foliar de *Psychotria velloziana* Benth. (Rubiaceae). Rodriguésia 45/49 (71/75): 39-50.

- DAVID R e CARDE JP. 1964. Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l' Academie dès Sciences Paris, série D258, p.1338-1340.
- DE MELO JG, DO NASCIMENTO VT, DE AMORIM ELC, DE ANDRADE LIMA CS e DE ALBUQUERQUE UP. 2004. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). Rev. Bras. Farmacogn. 14(2): 111-120.
- DEAN JM e SMITH AP. 1978. Behavioral and morphological adaptations of a tropical plant to high rainfall. Biotropica 10(2): 152-154.
- ENGEVIX. 1995. Caracterização do meio físico da área autorizada para a criação do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - Relatório técnico final dos estudos – 8296 - RG-H4-003/94, "ver. 1". IEF/BIRD/pró-floresta/Seplan, 34 p.
- EVERT RF. 2006. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3 ed. New Jersey/Canada: John Wiley & Sons, Inc, 601 p.
- FURR M e MAHLBERG PG. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44 (2) : 153-159.
- GABE M. 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson & Cie, 1113 p.
- GANTER P e JOLLES G. 1969. Histologie normale et pathologique. vol 1. Paris: Gauthier, Villars, 1904 p.
- GATTUSO M, DI SAPIO O, GATTUSO S e LI PEREYRA E. 2004. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. Phytomedicine 11: 213-223.
- GEISSMAN TA e GRIFFIN TS. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. Phytochemistry 10: 2475-2485.
- GERMANO-FILHO P. 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C.Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. Rodriguésia 50(76/77): 49-75.
- GIVNISH TJ. 1988. Adaptation to sun and shade: a whole plant perspective. Australian Journal of Plant Physiology 15: 63-92.

- GOMES DMS, MANTOVANI A e VIEIRA RC. 1995. Anatomia foliar de *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. e *Psychotria stenocalix* Muell. Arg. (RUBIACEAE). Arq. Biol. Tecnol. 38(1): 15-33.
- GOMES DMS, ARRUDA RCO, GOMES M e VIEIRA RC. 2000. Anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. e *B. australis* (St. Hil.) Hook. F (Rubiaceae) da Mata Atlântica, RJ, Brasil. Leandra 15: 59-72.
- HARDMAN R e SOFOWORA EA. 1972. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. Stain Technology 47(4): 205-208.
- JENSEN WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 408 p.
- JOHANSEN DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 423 p.
- JOHNSON HB. 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. Bot. Rev. 41:233-258.
- KOCSIS M, DARÓK J e BORHIDI A. 2004. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical *Rondeletia* (Rubiaceae) species. Plant Syst Evol 248: 205-218.
- KOLALITE MR, OSKOLSKI AA, RICHTER HG e SCHMITT U. 2003. Bark anatomy and intercellular canals in the stem of *Delarbrea paradoxa* (Araliaceae). IAWA J. 24: 139-154.
- LEITE JPV, FERNANDES JM, FÁVARO LB, GONTIJO DC, MAROTTA CPB, SIQUEIRA LC, MAIA RT e GARCIA FCP. 2008. Plantas medicinais do entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. MG BIOTA 1(4): 16-34.
- MACE ME, BELL AA e STIPANOVIC RD. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. Phytopathology 64:1297-1302.
- MACE ME e HOWELL CR. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. Canadian Journal of Botany 52: 2423-2426.

- MACHADO SR, MARCATI CR, MORRETES BL e ANGYALOSSY V. 2005. Comparative bark anatomy of root and stem in *Styrax camporum* (Styracaceae). IAWA Journal 26(4): 477-487.
- MAIA V. 1979. Técnica histológica. São Paulo: Atheneu, 298 p.
- METCALFE CR e CHALK L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. vol. 2. Oxford: Clarendon Press, 1500 p.
- NASCIMENTO MVD, GOMES DMS e VIEIRA RC. 1996. Anatomia foliar de *Bathysa stipulata* (Vell.) Presl. (Rubiaceae). Unimar 18: 387-401.
- NUNES ECM, MARIATH JEA e OLIVEIRA PL. 1994. Morfologia e anatomia da folha de espécies da secção III (sensu Ehrendorfer) do gênero *Relbunium* (Rubiaceae). Iheringia Sér. Bot. 44: 113-149.
- NUNES LG. 2008. Avaliação de mutagenicidade in vitro e prospecção fitoquímica de três espécies vegetais: *Strychnos pseudo-quina*, *Coutarea hexandra* e *Bathysa cuspidata*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- O'BRIEN TP, FEDER N e MCCULLY ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373.
- OLIVEIRA MG, GOMES DMS e MOURA MVLP. 2003. Anatomia e micromorfologia foliar de *Melanopsidium nigrum* Colla. Floresta e Ambiente 10(2): 87-94.
- PEARSE AGE. 1980. Histochemistry theoretical and applied. vol. 2. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingston.
- PEREIRA ZV, MEIRA RMSA e AZEVEDO AA. 2003. Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). Revista Árvore 27: 759-767.
- PYYKKÖ M. 1979. Morphology and anatomy of leaves from some woody plants in a humid tropical forest of Venezuelan Guayana. Acta Botanica Fennica 112: 1-41.
- RIZZINI CT. 1977. Sistematização terminológica da folha. Rodriguésia 29: 103-125.
- ROESER KR. 1972. Die nadel der Schwarz Kiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. Mikrokosmos 61: 33-36.
- ROTH I. 1984. Stratification of tropical forest as seen in leaf structure - Tasks for vegetation science. Hague: Ed. H. Lieth, 507 p.

- SALATINO A, MONTENEGRO G e SALATINO MLF. 1986. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. Rev. Brasil. Bot. 9(2): 117-124.
- SOLEREDER H. 1908. Systematic Anatomy of the Dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany. vol. 2. Oxford: Clarendon Press, 1183 p.
- TAIZ L e ZEIGER E. 2004. Fisiologia Vegetal. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 719 p.
- TAVARES ES e VIEIRA RC. 1994. Anatomia foliar de *Coussarea meridionalis* (Vell.) Muell. Arg. E *Coussarea graciliflora* Benth. & Hook (Rubiaceae). Bradea 6(39): 320-330.
- TURNER IM. 2001. The ecology of trees in the tropical rain forest. New York: Cambridge University Press, 298 p.
- VAN BEL AJE. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. Plant, Cell and Environment 26: 125-149.
- VANDERLINDE FA, GERMANO-FILHO P, ALEGRIO LV, ROCHA FF, LORENZO MA, SOUSA RH, SILVEIRA JWS, MARINHO-JÚNIOR A, MATOS LG e COSTA EA. 2001. Mecanismo antiinflamatório envolvido na atividade antinociceptiva do extrato etanólico e da fração diclorometânica das folhas da *Bathysa cuspidata* (Saint-Hilaire) Hooker. Revista de Ciências Biológicas e da Saúde, Rio de Janeiro 2(3): 89-100.
- VIDAL BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. Ann. Histochem. 15: 289-296.
- VIEIRA RC. 1986. *Diodia radula* (Willd. Et Hoffm.) Cham. Et Schlecht. (Rubiaceae) anatomia foliar. Rev Bras Biol 46: 667-674.
- VIEIRA RC. 1986/88. *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae) anatomia foliar. Rodriguésia 64/66: 33-39.
- VIEIRA RC, GOMES DMS e FERRAZ CLA. 1992. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *Psychotria leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). Hoehnea 19: 185-195.

CAPÍTULO 2

Anatomia do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae)

RESUMO – O presente trabalho vem contribuir com informações sobre a anatomia do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae), coletada em Floresta Atlântica, no Município de Araponga, Estado de Minas Gerais (20° 43' 00,0'' S e 42° 29' 10,8'' W, 1.200 m altura). Três indivíduos de *B. cuspidata* foram coletados e processados de acordo com técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica de varredura. O lenho de *B. cuspidata*, quando fresco, é amarelo e tem cheiro herbal. Quando seco, possui textura fina, coloração variando de amarelo avermelhado a marrom escuro, brilho moderado, cheiro imperceptível e moderada resistência ao corte. Caracteriza-se anatomicamente como sendo do tipo II de lenho em Rubiaceae, constituído de fibras libriformes septadas, parênquima axial ausente, vasos múltiplos ou solitários e raios largos (2-4 células ou mais) com margem formada por poucas camadas de células eretas e quadradas. As placas de perfuração são simples, intermediárias entre simples e esclariforme ou mais raramente de formato incomum (em oito, piriforme). As pontuações intervasculares são alternas, areoladas e guarnecidas. Os índices de vulnerabilidade e de mesomorfia indicam que os três espécimes estudados estão adaptados às condições métricas da Serra do Brigadeiro.

Introdução

A família Rubiaceae, com aproximadamente 611 gêneros e cerca 13.200 espécies (World Checklist of Rubiaceae 2008), é a maior em número de espécies dentro da ordem Gentianales e destaca-se como uma das maiores famílias das Angiospermas, ocupando o quarto lugar em diversidade, perdendo apenas para Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (Mabberley 1997). Robbrecht e Manen (2006), baseados em dados moleculares (rbcL, rps16, trnL-trnF e atpB-rbcL), reconstruíram a filogenia da família e apresentaram uma nova classificação para Rubiaceae, propondo apenas duas subfamílias, Cinchonoideae e Rubioideae.

Bathysa possui 15 espécies de árvores, arvoretas e arbustos exclusivamente neotropicais, ocorrendo sempre em formações florestais em altitudes entre 600-800(1100) metros (Germano-Filho 1999). Pertence à tribo Rondeletieae, subfamília Cinchonoideae, a mesma subfamília das tradicionais “quinas” historicamente usadas contra malária. No Brasil, existe registro de sete espécies: *B. australis* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. f., *B. gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. nicholsonii* K. Schum., *B. stipulata* (Vell.) J. Presl e *B. sylvestrae* Germano-Filho & M. Gomes, todas exclusivamente de Floresta Atlântica das regiões sudeste e sul do país. *B. cuspidata*, uma das espécies conhecida popularmente como “quina”, “quina-do-mato” e “quina-cinzenta”, tem a casca do caule usada na medicina popular como tônica, febrífuga, para doenças do estômago e fígado (Germano-Filho 1999, Botsaris 2007) e como cicatrizante pela população do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) e seu entorno (Leite et al. 2008).

Mais de 80% dos gêneros da família Rubiaceae são constituídos predominantemente por espécies lenhosas (Robbrecht 1988). Estudos recentes demonstram a importância da anatomia da madeira dentro da família e do gênero *Bathysa*. Ceccantini e Angyalossy-Alfonso (2000) estudaram a morfologia e tamanho das células perfuradas do raio em *Bathysa meridionalis* (sinônimo de *B. australis*) e comparam suas características com as células do raio e elementos de vaso vizinhos; Jansen et al. (2002) fazem uma extensa revisão sobre a anatomia da madeira aplicada à sistemática em Rubiaceae; Luchi (2003) relata a ocorrência de placas de perfuração incomuns em *B. nicholsonii*, destacando sua ocorrência em uma família que possui quase que exclusivamente placas de perfuração simples; Froufe et al. (2005, dados não publicados), estudaram a aptidão de espécies dos gêneros *Bathysa* e *Coussarea* para a produção de papel.

Tendo em vista a importância de estudos com anatomia da madeira na família Rubiaceae, o presente trabalho visa contribuir com informações sobre a anatomia do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. (Rubiaceae) e relaciona algumas dessas características com prováveis adaptações ecológicas da espécie no ambiente de Floresta Atlântica.

Material e Métodos

Material vegetal e local de coleta

O estudo foi conduzido na propriedade de “Seu Dico” no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), próximo ao Pico do Boné (20° 43’ 00,0’’ S e 42° 29’ 10,8’’ W, 1.200 m altura), município de Araponga, Minas Gerais. A licença para a realização de coleta de material vegetal no entorno de unidade de conservação foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta (UC 073/07). A vegetação florestal existente na Serra do Brigadeiro é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa (Veloso et al. 1991). O clima da região é do tipo Cw_b de Köpen – mesotérmico, com verões frescos e chuvosos e invernos frios e secos. A temperatura média anual é de 18°C e a precipitação média anual é de cerca de 1.300 mm. Os tipos de solo predominantes são: Latossolo Vermelho-Amarelo, Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico, Cambissolos e Litossolos (Engevix 1995).

Foram coletadas amostras de três indivíduos adultos (ver tabela 1), de uma mesma população, à altura do peito (AP), na região do caule antes da primeira ramificação. As amostras coletadas no PESB foram divididas em duas partes: (1) constituída de ramos, foi herborizada e posteriormente depositada como material testemunho no Herbário VIC da UFV, em Viçosa, MG, sob o número de registro VIC 21.445; (2) constituída de lenho do caule, foi fixada com FAA₇₀ ainda na área de estudo, permanecendo no fixador sob vácuo durante cinco dias, sendo posteriormente conservada em etanol 70%.

Tabela 1: Informações gerais sobre os indivíduos de *Bathysa cuspidata* amostrados.

| Indivíduo | Altura (m) | AP (cm)* | CAP (cm)** | Localização |
|-----------|------------|----------|------------|------------------|
| Pesb 1 | 7 | 122 | 41 | Borda da mata |
| Pesb 2 | 10 | 126 | 47 | Interior da mata |
| Pesb 3 | 7 | 115 | 38 | Interior da mata |

(*) AP = altura aproximada do peito; (**) CAP = circunferência à altura do peito.

Microscopia de luz

Parte das amostras de lenho foi processada no Laboratório de Propriedades Físicas e Mecânicas da Madeira do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os corpos de prova foram adequadamente orientados nos planos transversal, tangencial e radial, conforme recomendações do COPANT (1974). Secções com 15-25 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo de deslize (SM 2000R, Leica), clarificadas em hipoclorito de sódio 50% e coradas com safranina aquosa 1% (Bukatsch 1972) ou violeta cristal 1% aquoso, desidratadas em série etanólica/acetato de butila, e montadas em lâminas permanentes com resina sintética (Entellan[®]).

Outra parte foi processada no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. Corpos de prova com 3 mm² devidamente orientados nos três planos (transversal, longitudinal tangencial e radial), foram amolecidos durante cerca de 25 dias em etilenodiamina 40% (Carlquist 1982, modificado), lavados em água por 3 vezes durante 5 minutos, desidratados em série etílica crescente e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. Secções dos três planos de corte foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica) com 5µm de espessura, utilizando-se navalhas de vidro. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (O'Brien et al. 1964), durante 30 minutos, lavadas rapidamente em água, sequencialmente coradas com azul de toluidina 0,12% em bórax 5% (Kraus e Arduin 1997) durante 3 minutos e algumas lâminas foram posteriormente coradas com lugol (Johansen, 1940) diluído (1:3), durante cerca de 1 minuto, para a detecção de amido. Para confecção de lâminas permanentes utilizou-se resina sintética (Permout). Para o estudo de material dissociado pequenos fragmentos foram colocados em tubos de ensaio com peróxido de oxigênio 30% e ácido acético glacial 1:1 (v/v), em estufa a 60°C durante 48-72h. Posteriormente, o material foi lavado em água corrente, corado com azul de astra aquoso 1% (Roeser 1972) e montado em água glicerinada 1:1 (v/v).

As descrições anatômicas e análises quantitativas do lenho seguiram as recomendações da Associação Internacional dos Anatomistas de Madeira (IAWA committe 1989). As imagens foram registradas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) equipado com sistema U-photo acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic. As mensurações foram realizadas com software Image-Pro Plus 4.1 para Windows[®] (Media Cybernetics

Silver Spring, MD, USA) ou em microscópio de luz (Olympus CBA) acoplado à câmara clara. Foram realizadas 30 medidas de cada parâmetro (ver tabelas 2,3 e 4) para cada repetição (indivíduo), perfazendo um total de 90 medidas. Parte do material foi fotografado em microscópio estereoscópico (Olympus, SZH-ILLK), com câmara analógica acoplada (Olympus, Winding C-35 AD-4). Também foram calculados os índices de vulnerabilidade ($v = \text{diâmetro dos elementos de vaso/freqüência de vasos}$) e de mesomorfia ($m = v \times \text{comprimento dos elementos de vaso}$) (Carquist 1977).

Microscopia eletrônica de varredura

Os corpos de prova após seccionamento em micrótomo de deslize em diferentes planos (transversal, longitudinal tangencial e radial) e material macerado foram secos a temperatura ambiente e fixados em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla-face. Após a metalização com ouro (20 nm) em equipamento apropriado (Balzers SCA 010), as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP) a 15-20 kV do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Resultados

Características gerais

O lenho de *Bathysa cuspidata*, quando fresco, é amarelo e tem cheiro herbal (Figura 1A). Os corpos de prova após cozimento, seccionamento e secagem em temperatura ambiente, possuem textura fina, coloração variando de amarelo avermelhado a marrom escuro, brilho moderado, cheiro imperceptível e moderada resistência ao corte (Figura 1A; 4A,C).

Anatomia do lenho

Lenho com de porosidade difusa, camadas de crescimento não distinguíveis e vasos não visíveis à vista desarmada (Figura 1A-B). Poros/Vasos: formato e tamanhos variados (Figura 3A), geralmente de contorno anguloso, solitários, geminados ou mais comumente formando agrupamentos em linha radial ou em cachos com 4-6 células podendo chegar até 15 células (Figura 1B,I); placas de perfuração simples ou intermediárias entre simples e esclariforme (Figura 1C-E); algumas placas têm formato incomum (em oito, piriforme) (Figura 1F-H) e outras ocorrem nas laterais dos vasos (Figura 1L-M); apêndices presentes ou não, ocorrendo em uma ou em ambas as

extremidades dos elementos de vaso (Figura 1J; 3A); tilos ausentes (Figura 1B,I). Pontoações: intervasculares, alternas, areoladas, guarnecidas (Figura 2A-C); raio-vasculares, simples. Fibras: septadas, curtas, com formatos variados, paredes delgadas, podem apresentar bifurcações em uma ou ambas as extremidades (Figura 3B-C); pontoações fusiformes, simples (Figura 2D). Parênquima axial: ausente ou escasso (Figura 1B,I,M; 4B,E). Raio: altos, heterocelulares, uni ou multisseriados com até oito células de largura, corpo do raio formado por células procumbentes e margem formada por até três camadas de células quadradas e três camadas de células eretas (Figura 4A-D). Conteúdos orgânicos: grãos de amido e compostos fenólicos no parênquima radial e apenas grãos de amido no lume das fibras septadas (Figura 4E-F). Os dados quantitativos do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* estão sumarizados nas tabelas 2,3 e 4.

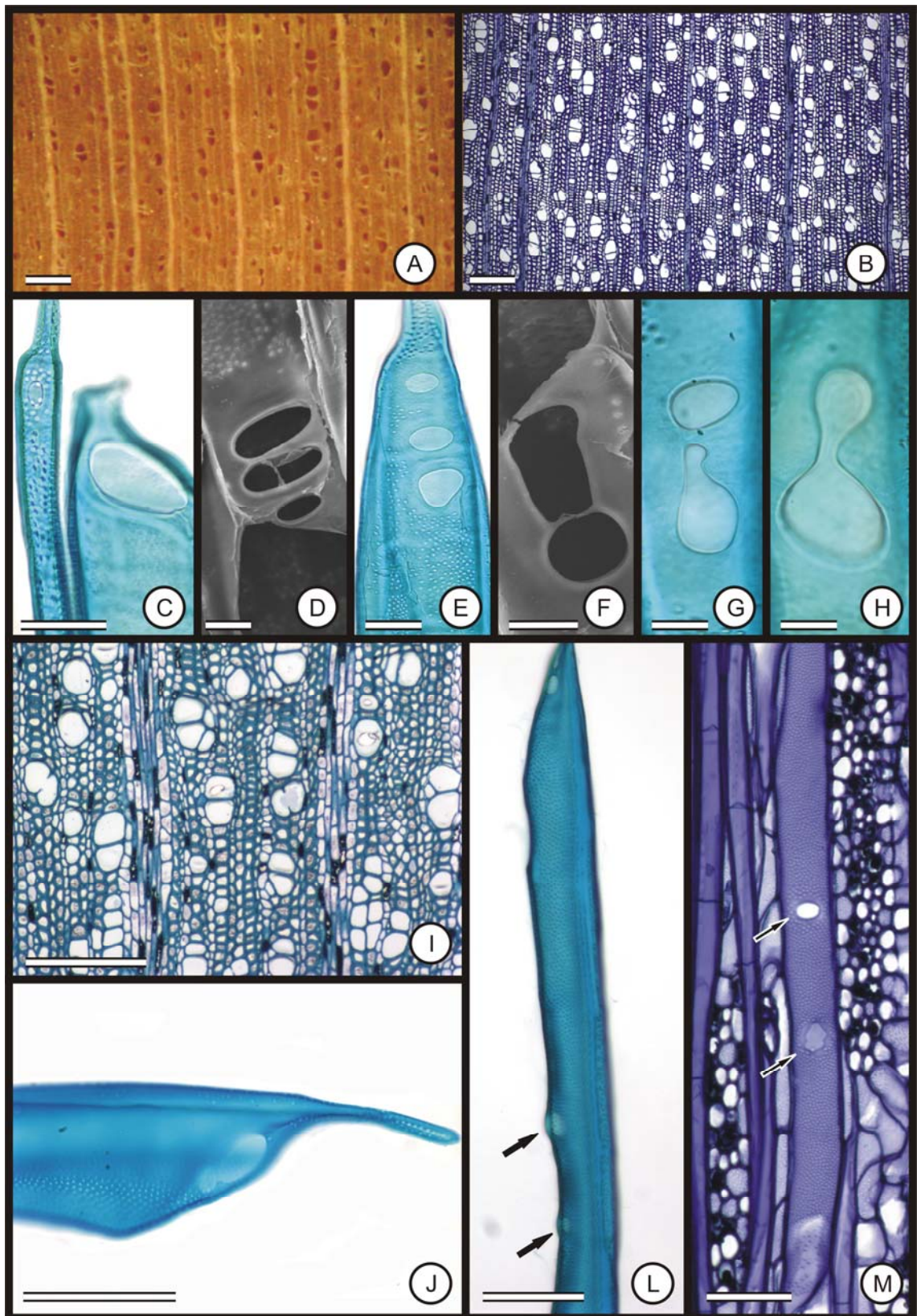


Figura 1A-M. Secções transversais (A-B e I), macerado (C-H e J-L) e secção longitudinal tangencial (M) do lenho de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Corpo de prova com coloração amarronzada. B. Porosidade difusa com camadas de crescimento não distinguíveis. C-H. Variação em número e forma das placas de perfuração. I. Vasos solitários, geminados ou agrupados. J. Apêndice. L-M. Placas de perfuração laterais (setas). Barra: A e B = 30 μm ; C, E, G e H = 100 μm ; D e F = 30 μm ; I = 300 μm , J-M = 100 μm .

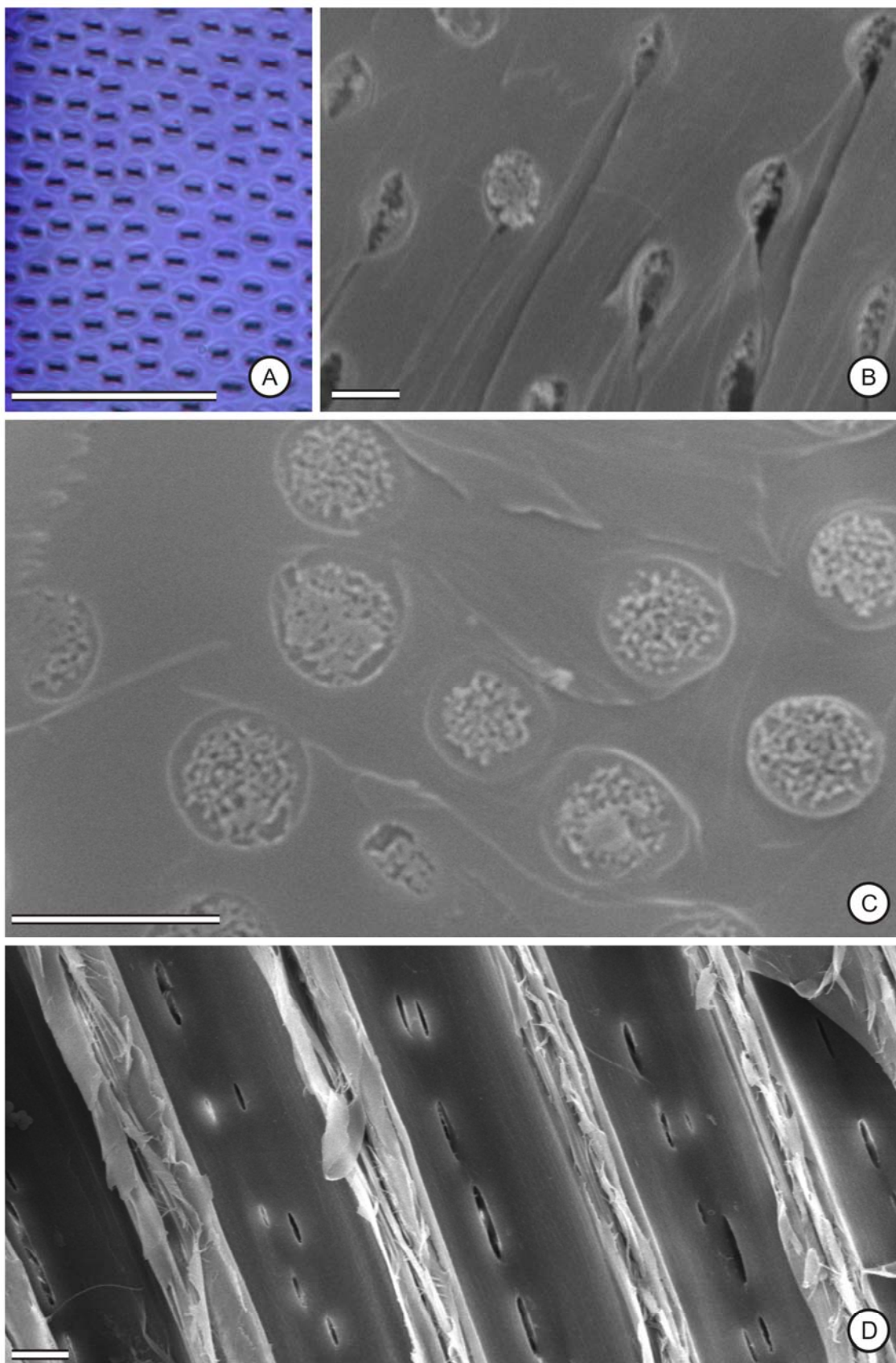


Figura 2A-D. Pontoações dos elementos de vaso (A-C) e fibras (D) do lenho de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A-C. Pontoações alternas guarnecidas. B. Face externa do vaso. C. Face interna do vaso. D. Pontoações simples em forma de fuso. Barra: A = 30 μm ; B = 2 μm ; C = 6 μm ; D = 10 μm .

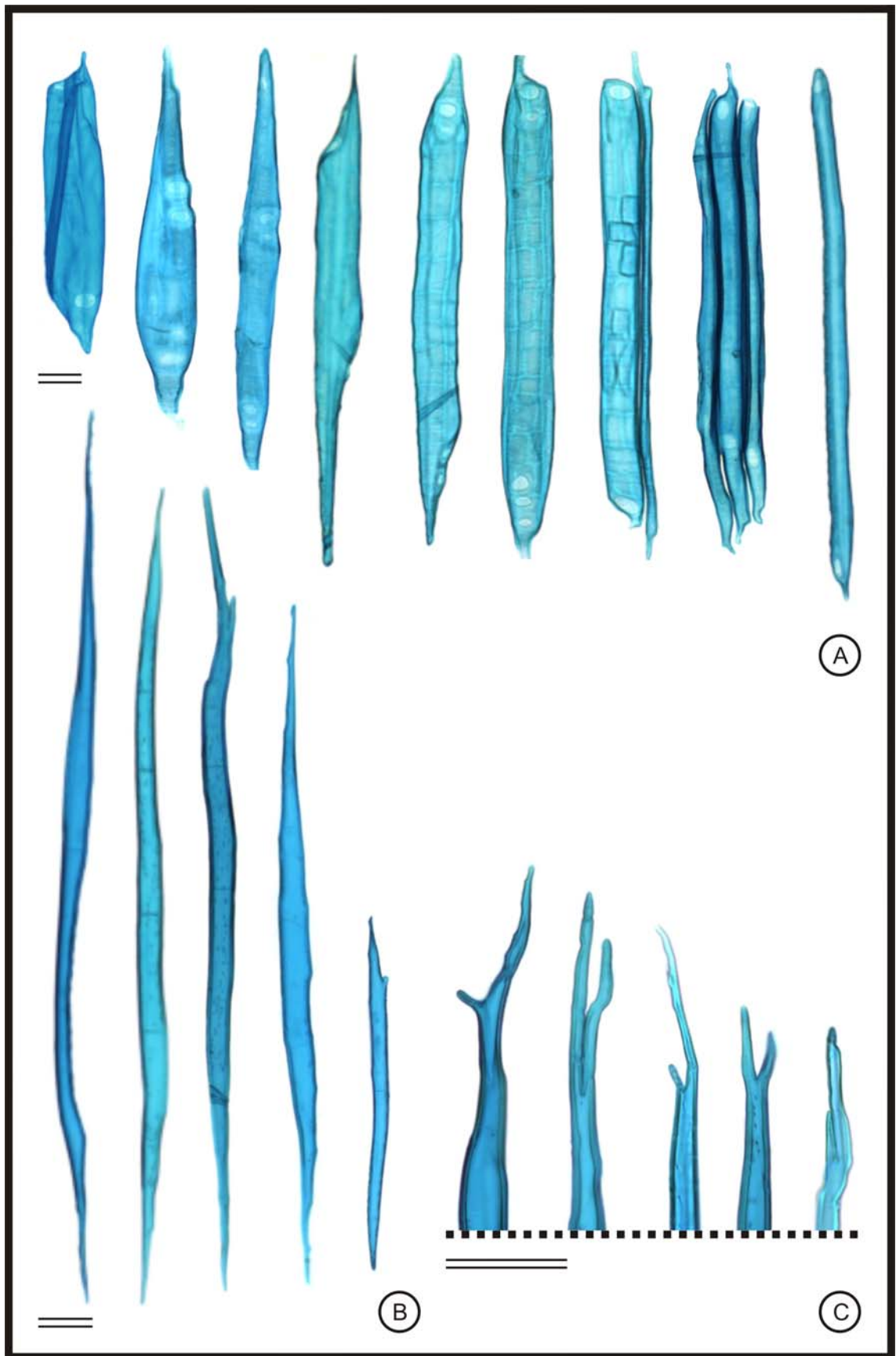


Figura 3A-C. Macerado do lenho de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A. Variações na forma e tamanho dos elementos de vaso. B. Variações na forma e tamanho das fibras septadas. C. Detalhes das fibras septadas com extremidades bifurcadas. Barra: A-C = 100 μ m.

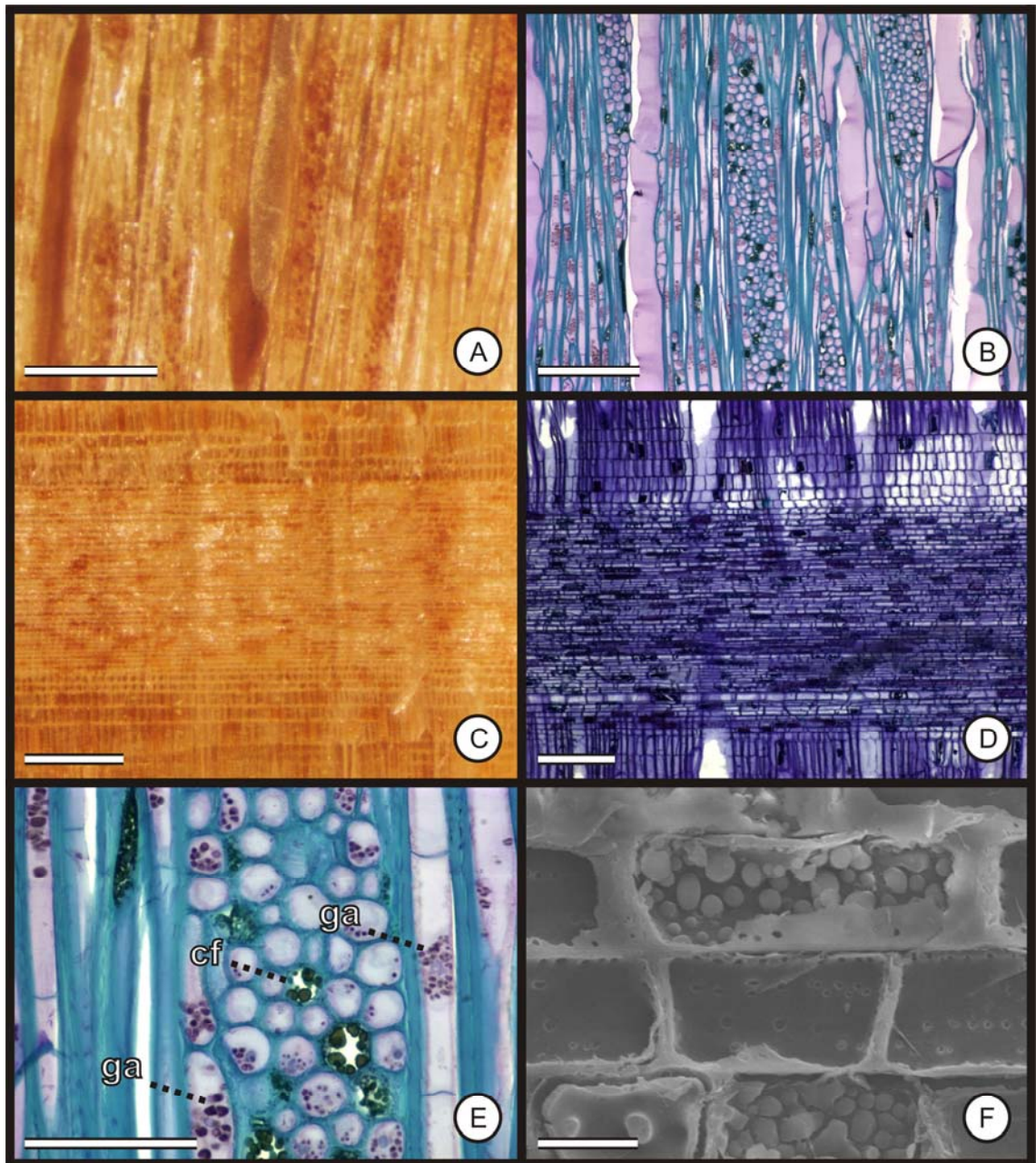


Figura 4A-F. Secções longitudinais tangenciais (A-B e E) e longitudinais radiais (C-D e F) do lenho de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f. A e B. Raios multisseriados. C e D. Corpo do raio formado por células procumbentes e margem formada de células quadradas e eretas. E. Detalhe do raio. F. Detalhe do parênquima radial com grãos de amido. Conteúdo fenólico (cf); grãos de amido (ga). Barra: A e C = 250 μm ; B e D = 350 μm ; E = 100 μm ; F = 20 μm .

Tabela 2: Características anatômicas quantitativas ((valor mínimo)-média-(valor máximo) ± desvio padrão) dos elementos de vaso do lenho de caule de *Bathysa cuspidata*. v = índice de vulnerabilidade; m = índice de mesomorfia.

| Indivíduo | Vaso | | | v | m |
|-----------|--|-------------------------------------|------------------------------------|-----|--------|
| | Comprimento (µm) | Diâmetro (µm) | Frequência (n. mm ²) | | |
| Pesb 1 | (724,5)- 1060,6 -(1469,4) ± 210,1 | (22,4)- 62,3 -(100,0) ± 20,3 | (55,0)- 59,2 -(66,0) ± 4,2 | 1,0 | 1060,6 |
| Pesb 2 | (729,9)- 1230,8 -(1699,9) ± 232,4 | (18,6)- 64,9 -(99,2) ± 21,7 | (29,0)- 37,2 -(43,0) ± 5,6 | 1,7 | 2092,3 |
| Pesb 3 | (699,4)- 1174,7 -(1509,8) ± 222,1 | (25,3)- 64,8 -(99,2) ± 15,0 | (34,0)- 42,1 -(48,0) ± 5,5 | 1,5 | 1762,0 |
| Média | (699,4)- 1155,4 -(1699,9) ± 230,5 | (18,6)- 64,0 -(100,0) ± 19,0 | (29,0)- 45,8 -(66,0) ± 11,0 | 1,3 | 1502,0 |

Tabela 3: Características anatômicas quantitativas ((valor mínimo)-média-(valor máximo) ± desvio padrão) das fibras septadas do lenho de caule de *Bathysa cuspidata*.

| Indivíduo | Fibras septadas | | |
|-----------|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| | Comprimento (µm) | Lume (µm) | Espessura da parede (µm) |
| Pesb 1 | (886,5)- 1369,8 -(1824,3) ± 263,3 | (8,6)- 21,4 -(34,1) ± 4,9 | (3,8)- 7,2 -(10,1) ± 1,4 |
| Pesb 2 | (623,6)- 1524,6 -(2139,2) ± 313,8 | (19,1)- 27,8 -(42,5) ± 5,8 | (3,5)- 6,9 -(10,9) ± 1,9 |
| Pesb 3 | (1099,8)- 1578,1 -(2249,1) ± 317,4 | (15,3)- 27,8 -(38,3) ± 5,2 | (4,3)- 6,2 -(8,6) ± 1,5 |
| Média | (623,6)- 1490,8 -(2249,1) ± 308,8 | (8,6)- 25,7 -(42,5) ± 6,0 | (3,5)- 6,8 -(10,9) ± 1,6 |

Tabela 4: Características anatômicas quantitativas ((valor mínimo)-média-(valor máximo) ± desvio padrão) dos raios do lenho de caule de *Bathysa cuspidata*.

| Indivíduo | Raios multisseriados | | | Raios unisseriados | | |
|-----------|----------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| | Largura | | Altura (µm) | Frequência (n. mm ⁻¹) | Altura (µm) | Frequência (n. mm ⁻¹) |
| | nº de células | espessura (µm) | | | | |
| Pesb 1 | (2)- 4,1 -(8) ± 1,6 | (35,7)- 63,0 -(107,1) ± 22,3 | (462,2)- 1109,4 -(2000) ± 349,1 | (4)- 5,6 -(9) ± 2,0 | (169,0)- 699,9 -(1056,3) ± 201,8 | (2)- 4,6 -(7) ± 1,9 |
| Pesb 2 | (2)- 4,2 -(6) ± 0,9 | (35,7)- 77,3 -(142,8) ± 29,7 | (607,1)- 1364,2 -(2642,8) ± 478,8 | (4)- 5,2 -(7) ± 1,3 | (140,8)- 618,2 -(1126,7) ± 251,1 | (5)- 7,2 -(10) ± 1,7 |
| Pesb 3 | (2)- 4,0 -(6) ± 1,1 | (35,7)- 67,8 -(107,1) ± 21,6 | (607,1)- 1427,3 -(2357,1) ± 572,5 | (4)- 5,4 -(7) ± 1,1 | (281,6)- 630,9 -(1183,0) ± 176,1 | (3)- 4,6 -(6) ± 1,1 |
| Média | (2)- 4,1 -(8) ± 1,2 | (35,7)- 69,4 -(142,8) ± 25,3 | (462,2)- 1300,3 -(2642,8) ± 490,2 | (4)- 5,4 -(9) ± 1,4 | (140,8)- 647,6 -(1183,0) ± 212,3 | (2)- 5,4 -(10) ± 1,9 |

Discussão

A estrutura anatômica qualitativa e quantitativa do lenho do caule de *Bathysa cuspidata* reflete as características gerais da família Rubiaceae, citadas por Solereder (1908), Metcalfe e Chalk (1950) e Jansen et al. (2002).

Baseado em uma série de estudos em anatomia da madeira realizados nos anos setenta, Koek-Noorman (1977) concluiu que existem dois tipos principais de xilema secundário em Rubiaceae. Cada tipo tem estreita relação com o tipo de fibra apresentado, que por sua vez tem estreita relação com outras características do lenho em Rubiaceae. Jansen et al. (2002) resumizam as características peculiares de cada tipo de lenho estabelecido por Koek-Noorman (1977) e atribuem importância taxonômica para cada um deles. O lenho do tipo I apresenta fibro-traqueídes, parênquima axial presente, vasos geralmente solitários e raios estreitos com margem unisseriada. O lenho do tipo II apresenta fibras libriformes septadas, parênquima axial ausente, vasos múltiplos ou solitários e raios largos (2-4 células ou mais) com margem formada por poucas camadas de células eretas e quadradas.

Os caracteres anatômicos observados em *B. cuspidata* apóiam a inclusão da espécie no grupo que possui lenho do tipo II na família Rubiaceae. Tradicionalmente, *Bathysa* tem sido incluído na tribo Rondeletieae (Robbrecht 1988, Delprete 1999). Segundo Jansen et al. (2002), essa circunscrição de Rondeletieae adotada por Robbrecht (1988) e Delprete (1999) apresenta os tipos I e II de lenho. Por outro lado pode-se atribuir uma maior homogeneidade a estrutura do lenho de Rondeletieae quando adotada a circunscrição baseada em dados moleculares proposta por Rova et al. (2002). O xilema secundário de Rondeletieae *sensu* Rova et al. (2002) parece ser caracterizado pelo lenho do tipo I e os gêneros que apresentam o tipo II de lenho (*Bathysa*, *Elaeagia*, *Macbrideina*, *Simira* e *Warszewiczia*) necessitam ser excluídos da tribo (Jansen et al. 2002). Esses mesmos autores sugerem que todos esses gêneros deveriam ser incluídos em um grande complexo Calycophylleae, Condamineae, Simireae e Hippotideae (Ixoroideae). Mais recentemente Robbercht e Manen (2006) reconstruíram a filogenia da família Rubiaceae, incluindo *Bathysa*, *Elaeagia*, *Macbrideina*, *Simira* e *Warszewiczia* no complexo Calycophylleae, Condamineae, Simireae e Hippotideae (Cal/Con) corroborando com Jansen et al. (2002). De acordo Robbercht e Manen (2006) esse complexo por eles denominado de aliança Cal/Con pertencente ao clado Ixoridinae I da supertribo Ixoridinae, subfamília Cinchonoideae.

Vasos com agrupamento predominantemente múltiplo e com agrupamento múltiplo e solitário foram encontrados em 17 e 76%, respectivamente, de 686 espécimes

estudados em diferentes climas, regiões e tipos vegetacionais do Brasil. Os vasos com arranjo predominantemente múltiplo são mais comuns na região sudeste e em florestas semi-decíduas (Alves e Angyalossy-Alfonso 2000). Esses dois tipos de agrupamento (múltiplo e solitário) foram observados em *B. cuspidata*, sendo os agrupamentos múltiplos mais comuns.

Placas de perfuração do tipo simples são comuns em Rubiaceae (Jansen et al. 2002). Entretanto, a ocorrência de placas de perfuração atípicas foi observada em *B. cuspidata* e também relatada para *Bathysa nicholsonii* (Luchi 2003). Em *B. cuspidata* as placas de perfuração atípicas são mais raras, predominando placas de perfuração simples ou múltiplas (intermediárias entre simples e escalariformes). Placas de perfuração múltiplas, formadas por mais de uma abertura, são comuns em espécies tropicais de montanhas altas e de climas temperados e mesotérmicos moderados, caracterizados por baixas temperaturas durante o inverno (Evert 2006).

As pontoações guarnecidas foram registradas em várias famílias de Angiospermas, sendo um caráter constante, quando presente. O valor taxonômico desse caráter foi avaliado por Bailey (1933), na análise de 152 famílias, onde 25 possuem pontoações guarnecidas e em apenas quatro delas esse caráter é inconstante, podendo estar presente ou ausente. Jansen et al. (2001), estudando a presença e a importância das pontoações guarnecidas na sistemática das eudicotiledôneas, observaram que estas caracterizam as ordens Myrtales e Gentianales *sensu* APG, sendo esta última a ordem à qual a família Rubiaceae está incluída (APG II 2003). Pontoações intervasculares alternas com guarnições, como observadas em *B. cuspidata*, são comuns em Rubiaceae (Jansen et al. 2002) e têm sido interpretadas como tendo valor adaptativo, pois atuam evitando a cavitação e embolia (Jansen et al. 1998).

Fibras septadas são amplamente distribuídas em eudicotiledôneas e bastante comuns em madeiras de espécies tropicais. Geralmente, retêm o protoplasto, tendo a função de estocagem de material de reserva (amido). A retenção do protoplasto pelas fibras é uma indicação de avanço evolutivo (Evert 2006). Conteúdos orgânicos como amido e compostos fenólicos encontrados no parênquima e apenas amido encontrado nas fibras de *B. cuspidata* são descritos na literatura para o lenho de muitas espécies (Butterfield 1976, Evert 2006). Da mesma forma, a presença de fibras com terminações bifurcadas de formatos variados, observadas no lenho do caule de *B. cuspidata*, é igualmente relatada para o lenho de raiz e caule de *Lipia salviifolia* (Verbenaceae) (Goulart e Marcati 2008) e de *Clusia criuva* Camb. (Clusiaceae) (Esemann-Quadros

2001). Estas variações nas extremidades da fibra são oriundas do crescimento intrusivo (Evert 2006).

Em campo pode-se perceber que a população onde foram coletados os indivíduos amostrados, tinha a propagação vegetativa como forma eficaz de reprodução. Desta forma, é de se esperar que a baixa variabilidade genética, propiciada por essa forma de reprodução, dentro dessa população, trouxesse uma uniformidade entre os caracteres quantitativos, confirmada na amostragem realizada para *B. cuspidata* (ver tabelas 2, 3 e 4). A partir dos índices de vulnerabilidade (v) e mesomorfia (m) pode-se inferir que os espécimes estudados estão adaptados às condições métricas da Serra do Brigadeiro, já que os valores estão dentro dos limites para espécies com características mesomórficas (1,0-2,5 (v) e ≥ 200 (m)) determinados por Carlquist (1977).

Conclusões

De acordo com as características anatômicas do lenho, *Bathysa cuspidata* deve ser incluída no grupo que possui lenho do tipo II na família Rubiaceae. A partir dos índices de vulnerabilidade e mesomorfia pode-se inferir que os espécimes estudados estão adaptados às condições métricas da Serra do Brigadeiro.

Referências Bibliográficas

- ALVES ES e ANGYALOSSY-ALFONSO V. 2000. Ecological trends in the wood anatomy of some brazilian species. 1. Growth rings and vessels. IAWA Journal 21(1): 3-30.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperme Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 399-436.
- BAILEY IW. 1933. The cambium and its derivate tissues VIII. Structure, distribution and diagnostic significance of the vestured pits in dicotyledons. Journal Arnold Arboretum 14: 259-273.
- BOTSARIS AS. 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 3: 18.
- BUKATSCH F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-safranin. Mikrokosmos 61: 255.
- BUTTERFIELD BG. 1976. The occurrence of septate fibres in some New Zealand Woods. New Zealand Journal of Botany 14: 123-130.
- CARLQUIST S. 1977. Ecological factors in wood evolution: a floristic approach. American Journal of Botany 64: 887-896.
- CARLQUIST S. 1982. The use of ethylenediamine in softening hard plant structures for paraffin sectioning. Stain Technol. 57(5): 311-317.
- CECCANTINI GCT e ANGYALOSSY-ALFONSO V. 2000. Perforated ray cells in *Bathysa meridionalis* (Rubiaceae). IAWA Journal 21(1): 77-82.
- COPANT – Comision Panamericana de Normas Técnicas. 1974. Descripción de características generales, macroscópicas y microscópicas de la madeira Angiospermae Dicotiledôneas. COPANT 30: 1-19.
- DELPRETE PG. 1999. Morphological and taxonomical comparison of the Cuban endemic taxa Ariadne, Mazaea, Phyllomelia and Eosanthe (Rubiaceae, Rondeletieae). Brittonia 51: 217-230.
- ENGEVIX. 1995. Caracterização do meio físico da área autorizada para a criação do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - Relatório técnico final dos estudos – 8296 - RG-H4-003/94, "ver. 1". IEF/BIRD/pró-floresta/Seplan, 34 p.

- ESEMANN-QUADROS K. 2001. Anatomia do lenho de *Clusia criuva* Camb. (Clusiaceae): órgãos, hábitos e ambientes. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- EVERT RF. 2006. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3 ed. New Jersey/Canada: John Wiley & Sons, Inc, 601 p.
- GERMANO-FILHO P. 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C.Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. *Rodriguésia* 50(76/77): 49-75.
- GOULART SL e MARCATI CR. 2008. Anatomia comparada do lenho em raiz e caule de *Lippia salviifolia* Cham. (Verbenaceae). *Revista Brasil. Bot.* 31(2): 263-275.
- IAWA Committee. 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. WHEELER EA, BAAS P e GASSON P (eds.). *IAWA Bulletin* 10: 219-332.
- JANSEN S, SMETS E e BAAS P. 1998. Vestures in woody plants: A review. *IAWA Journal* 19(4): 347-382.
- JANSEN S, BAAS P e SMETS E. 2001. Vestured pits: their occurrence and systematic importance in eudicots. *Taxon* 50: 135-167.
- JANSEN S, ROBBRECHT E, BEECKMAN H e SMETS E. 2002. A survey of the systematic wood anatomy of the Rubiaceae. *IAWA Journal* 23(1): 1-67.
- JOHANSEN DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 423 p.
- KOEK-NOORMAN J. 1977. Systematische Holzanatomie einiger Rubiaceen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 90: 183-190.
- KRAUS JE e ARDUIN M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica, RJ: EDUR, 198 p.
- LEITE JPV, FERNANDES JM, FÁVARO LB, GONTIJO DC, MAROTTA CPB, SIQUEIRA LC, MAIA RT e GARCIA FCP. 2008. Plantas medicinais do entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG BIOTA* 1(4): 16-34.
- LUCHI AE. 2003. Unusual perforation plates in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. *Hoehnea* 30(2): 121-125.

- MABBERLEY DJ. 1997. The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge, 874 p.
- METCALFE CR e CHALK L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. vol. 2. Oxford: Clarendon Press, 1500 p.
- O'BRIEN TP, FEDER N e MCCULLY ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373.
- ROBBRECHT E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Opera Botanica Belgica 1: 1-271.
- ROBBRECHT E e MANEN JF. 2006. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position de *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. Systematics and Geography of Plants 76: 85-146.
- ROESER KR. 1972. Die nadel der Schwarz Kiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. Mikrokosmos 61: 33-36.
- ROVA JHE, DELPRETE PG, ANDERSSON L e ALBERT VA. 2002. A *trnL*-cp DNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. Amer J Bot 89: 145-159.
- SOLEREDER H. 1908. Systematic Anatomy of the Dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany. vol. 2. Oxford: Clarendon Press, 1183 p.
- VELOSO HP, RANGEL-FILHO ALR e LIMA JCA. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro, IBGE, 124 p.
- WORLD CHECKLIST OF RUBIACEAE. 2008. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/reportbuilder.do?method=Reset>. Acessado em: 15/10/2008.

CAPÍTULO 3

Coléteres em *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f (Rubiaceae): estrutura, desenvolvimento e histoquímica

RESUMO – Este trabalho descreve a estrutura, o desenvolvimento e a histoquímica dos coléteres presentes em ápices vegetativos de *Bathysa cuspidata* (St. Hil.) Hook. f, uma espécie de Rubiaceae nativa de Floresta Atlântica e utilizada popularmente por suas propriedades medicinais. As amostras foram preparadas segundo técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura. Testes histoquímicos foram feitos com material recém coletado seccionado em micrótomo de mesa e com material incluído em metacrilato. Nesta espécie, os coléteres geralmente são do tipo padrão, formados por um corpo principal e um pedúnculo curto. O corpo principal é constituído de um eixo axial central, não secretor e por um epitélio secretor cujas células estão dispostas em paliçada. Também foram observados coléteres bifurcados, descritos anteriormente, apenas para Apocynaceae e reportados pela primeira vez em Rubiaceae. Os coléteres estão ligados à face interna das estípulas, se distribuem de forma aleatória circundando as folhas jovens, primórdios foliares e meristema, que se acham recobertos por uma secreção incolor e brilhosa de natureza mucilaginosa. Começam a secretar muito cedo, concomitante com a expansão dos primórdios foliares, mantendo-se funcionais até a senescência. As estípulas são caducas, caem com a expansão das folhas jovens e os coléteres nessa fase secam e murcham. Não foram observadas evidências de poros ou ruptura da cutícula. A origem dos coléteres é mista, envolvendo a protoderme, procâmbio e o meristema fundamental. Em todas as amostras analisadas, os testes histoquímicos detectaram polissacarídeos, pectinas, compostos fenólicos e proteínas.

Introdução

Os coléteres estão presentes em cerca de 60 famílias de Angiospermas, sendo Rubiaceae uma das mais bem estudadas (Lersten 1974a, 1974b, 1975, Thomas 1991, Barreiro e Machado 2007). Alguns autores (Fahn 1979, Thomas 1991, Paiva e Machado 2006, Barreiro e Machado 2007) têm usado o termo coléter para estruturas secretoras encontradas na superfície adaxial de órgãos vegetativos e/ou reprodutivos jovens, que produzem uma secreção pegajosa, formada por mucilagem ou uma mistura de mucilagem e terpenos, a qual é atribuída a função de lubrificar e proteger meristemas e órgãos em desenvolvimento contra dessecação, herbívoros e patógenos.

As folhas em desenvolvimento das espécies de *Bathysa* estão envoltas por estípulas providas de coléteres que secretam mucilagem (Germano-Filho 1999). Em *B. australis* a mucilagem produzida pelos coléteres encontrados nos ápices vegetativos é usada na medicina popular como cicatrizante (Leoni 1995).

Bathysa nicholsonii é a única espécie do gênero com dados já publicados para anatomia dos coléteres, onde há registro de coléteres do tipo padrão que contêm proteínas com atividade antifúngica em sua secreção (Miguel et al. 2006). Outras duas espécies em que os coléteres já foram estudados, mas os dados ainda não foram publicados são *B. gymnocarpa* e *B. stipulata* (Miguel et al. 2003, dados não publicados).

Bathysa cuspidata, chamada de “quina-do-mato” ou “quina-cinzenta” possui a casca do caule usada na medicina popular como tônica, febrífuga, para doenças do estômago, fígado e como cicatrizante (Germano-Filho 1999, Botsaris 2007, Leite et al. 2008).

Diante da importância medicinal de *Bathysa cuspidata*, do uso do exsudado dos coléteres de outras espécies de *Bathysa* na medicina popular e em ensaios biológicos, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a estrutura, desenvolvimento e secreção dos coléteres de *Bathysa cuspidata*.

Material e Métodos

Material vegetal e local de coleta

Foram coletados ramos contendo ápices vegetativos de três indivíduos localizados na propriedade de “Seu Dico”, no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), próximo ao Pico do Boné (20° 43’ 00,0’’ S e 42° 29’ 10,8’’ W, 1.200 m altura), município de Araponga, Minas Gerais. A licença para a realização de coleta de material vegetal no entorno de unidade de conservação foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta (UC 073/07). As amostras coletadas no PESB foram divididas em três partes: (1) ramos férteis herborizados e posteriormente depositados como material testemunho no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, sob o número de registro VIC 21.445; (2) constituída apenas de ápices, fixados na área de estudo para caracterização estrutural; e (3) amostras usadas para realização de testes histoquímicos, constituídas de mudas de 20 a 40cm (contendo ápices vegetativos). As mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3,5 litros, com substrato do local de coleta, posteriormente mantidas no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal, sob sombrite com 50% de cobertura, e regadas com água a cada dois dias.

Microscopia de luz

Para o estudo anatômico dos coléteres, as amostras de ápices vegetativos em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas (Johansen 1940) ou solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05M por 24 horas. As amostras fixadas em glutaraldeído foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio 0,05M por 3 vezes, 15 minutos cada. Todo material fixado foi estocado em etanol 70% e posteriormente desidratado em série etílica crescente, incluído em metacrilato (Historesin, Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. Secções transversais e longitudinais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), com 5µm de espessura, coradas com azul de toluidina (O’Brien et al. 1964) para metacromasia, secas à temperatura ambiente e montadas com resina sintética (Permount).

Para detectar as principais classes de metabólitos foram realizados testes histoquímicos com amostras frescas, seccionadas em micrótomo de mesa. As seções transversais dos ápices vegetativos foram submetidas a diferentes corantes e reagentes: sudan vermelho escarlata (Brundrett et al. 1991) e sudan black B (Pearse 1980) para

lipídios totais; floroglucina (Jensen 1962) para ligninas; xylidine ponceau (Vidal 1970) para proteínas, ácido periódico/reagente de Schiff (Maia 1979) para polissacarídeos neutros; reagente de Lugol (Johansen 1940) para amido, vermelho de Rutênio (Johansen 1940) e corifosfina (Ueda e Yoshioka 1976) para substâncias pécicas. Parte do material incluído em metacrilato foi reservada para realização de testes histoquímicos para lipídios, polissacarídeos neutros, amido, substâncias pécicas e proteínas. Tratamento controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, segundo indicado pelos autores acima referidos.

As imagens digitalizadas foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-PHOTO, acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic. A análise com fluorocromos (corifosfina) foi realizada no mesmo equipamento, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 340-380nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm), do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. Parte do material foi fotografado em microscópio estereoscópico (Olympus, SZH-ILLK), com câmera analógica acoplada (Olympus, Winding C-35 AD-4) do mesmo laboratório.

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica, ápices vegetativos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05M por 24 horas. Posteriormente, foram desidratados em série etanólica crescente e levados à secagem em ponto crítico de CO₂, utilizando-se equipamento CPD 020, Bal-Tec. Após a montagem das amostras nos suportes metálicos com fita dupla-face, realizou-se a deposição metálica com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec). A análise e a captura de imagens foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO 1430 VP, Zeiss, do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Resultados

O ápice vegetativo, no período do brotamento, é protegido por estípulas verde-claras intumescidas, densamente pilosas externamente (Figura 1A,B). De fora para dentro, os elementos que compõem o ápice vegetativo se organizam da seguinte forma: estípulas, coléteres, folhas jovens, primórdios foliares e o meristema no centro (Figura 1C-F). Os coléteres estão ligados à face interna das estípulas, se distribuem de forma aleatória, circundando todas as estruturas mais internas que se acham recobertas por

uma secreção incolor e brilhosa. Quando exposta ao ambiente a secreção oxida-se rapidamente, adquirindo uma coloração que vai de esbranquiçada, palha até marrom claro (Figura 1B). Os coléteres começam a secretar muito cedo, concomitante com a expansão dos primórdios foliares, e o exsudado cobre completamente as estruturas em desenvolvimento (Figura 1B,E).

Os coléteres de *Bathysa cuspidata* são do tipo padrão (Figura 2A) ou mais raramente bifurcados (Figura 2B,C). Os do tipo padrão caracterizam-se por um corpo principal, formado por um eixo axial parenquimático não secretor provido de traços vasculares, rodeado pelo epitélio secretor em paliçada, unisseriado ou bisseriado em algumas regiões, sobre um pedúnculo curto (Figura 2A,D,E; 5B). Os bifurcados são semelhantes aos do tipo padrão, exceto pela separação na porção apical (Figura 2 B,C). As células parenquimatosas do eixo axial são alongadas axialmente com núcleo e nucléolo conspícuos, citoplasma escasso e vacúolos volumosos (Figura 2A,E). As células do epitélio têm citoplasma denso, núcleo e nucléolo conspícuos, apresentando, muitas vezes, espaços entre as células cheios de secreção (Figura 2A,E; 3A,B). Todo o coléter é recoberto por uma cutícula uniformemente espessada que não apresenta evidências de rompimento ou poros (Figura 2D,E; 5A). No ápice dos coléteres, em microscopia de luz, pode-se observar o destacamento da cutícula da parede celular, resultando em um amplo espaço subcuticular preenchido pela secreção mucilaginosa (Figura 2D,E). Nessa mesma região, é freqüente a presença de estruturas semelhantes a pequenas bolhas, observadas apenas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 5A).

Os coléteres de *Bathysa cuspidata* mostraram reação positiva para polissacarídeos, pectinas (Figura 3A,B), proteínas (Figura 3C,D) e compostos fenólicos (Figura 3E) (ver tabela 1). Os fenólicos foram encontrados nas células do eixo axial e do epitélio secretor, cujo conteúdo foi corado de verde pelo azul de toluidina. Os polissacarídeos e pectinas foram encontrados principalmente nas células do epitélio secretor. A presença de proteínas foi registrada em material resinado e a fresco, principalmente nas células do epitélio secretor, embora tenha apresentado reação mais evidente na secreção externa presente em material fresco (Figura 3D).

A formação dos coléteres em *B. cuspidata* tem envolvimento da protoderme (epitélio secretor), meristema fundamental (eixo axial parenquimático) e procâmbio (traços vasculares). O primórdio dos coléteres caracteriza-se por uma pequena protuberância formada de protoderme e meristema fundamental subepidérmico. As células da protoderme possuem citoplasma mais denso que as demais, são visualmente

distintas por serem alongadas verticalmente e sofrerem divisões anticlinais. As células do meristema fundamental têm citoplasma menos denso, são isodiamétricas e sofrem divisões em diferentes planos (Figura 4A). Com a continuação das divisões celulares em ambos os tecidos essa protuberância se desenvolve assumindo forma de cúpula (Figura 4B). Após essa fase, ocorre uma constrição na base conferindo um aspecto de pedúnculo a essa região, porém o eixo axial e epitélio secretor ainda não estão totalmente diferenciados (Figura 4C). Ao longo do desenvolvimento de alguns coléteres, ocorreu uma diferenciação assimétrica das células do epitélio secretor (Figura 4D). Durante a diferenciação do corpo principal, as células do epitélio secretor alongam-se assumindo arranjo de paliçada e sofrem várias divisões anticlinais. A expansão do eixo axial é resultante do alongamento vertical e de várias divisões peri e anticlinais de suas células. Algumas células do epitélio secretor podem sofrer divisões periclinais, formando regiões bisseriadas. As células do pedúnculo sofrem divisões anticlinais não assumindo características muito distintas das células da epiderme (Figura 4E). Nessa fase pode-se perceber a diferenciação de traços vasculares (Figura 5B). O coléter maduro é marcado pelo amplo desenvolvimento do eixo axial e do epitélio secretor. Também se verificou assimetria no epitélio secretor de alguns coléteres quando maduros (Figura 4F). Os coléteres entram em senescência ainda antes da abertura das estípulas, com as folhas jovens em expansão e essa fase é marcada pela mudança gradual na coloração original dos coléteres para tons de marrom. Essa mudança acontece do ápice para base e a presença de mucilagem ainda pode ser constatada (Figura 5C). Com a expansão das folhas jovens, as estípulas se abrem, expondo as folhas ao ambiente, o que resulta no ressecamento dos coléteres, bem como do exsudado, sendo comum a escassez ou ausência de secreção líquida nessa fase. Posteriormente, os coléteres murcham, adquirem coloração marrom escuro e as estípulas caem (Figura 5D).

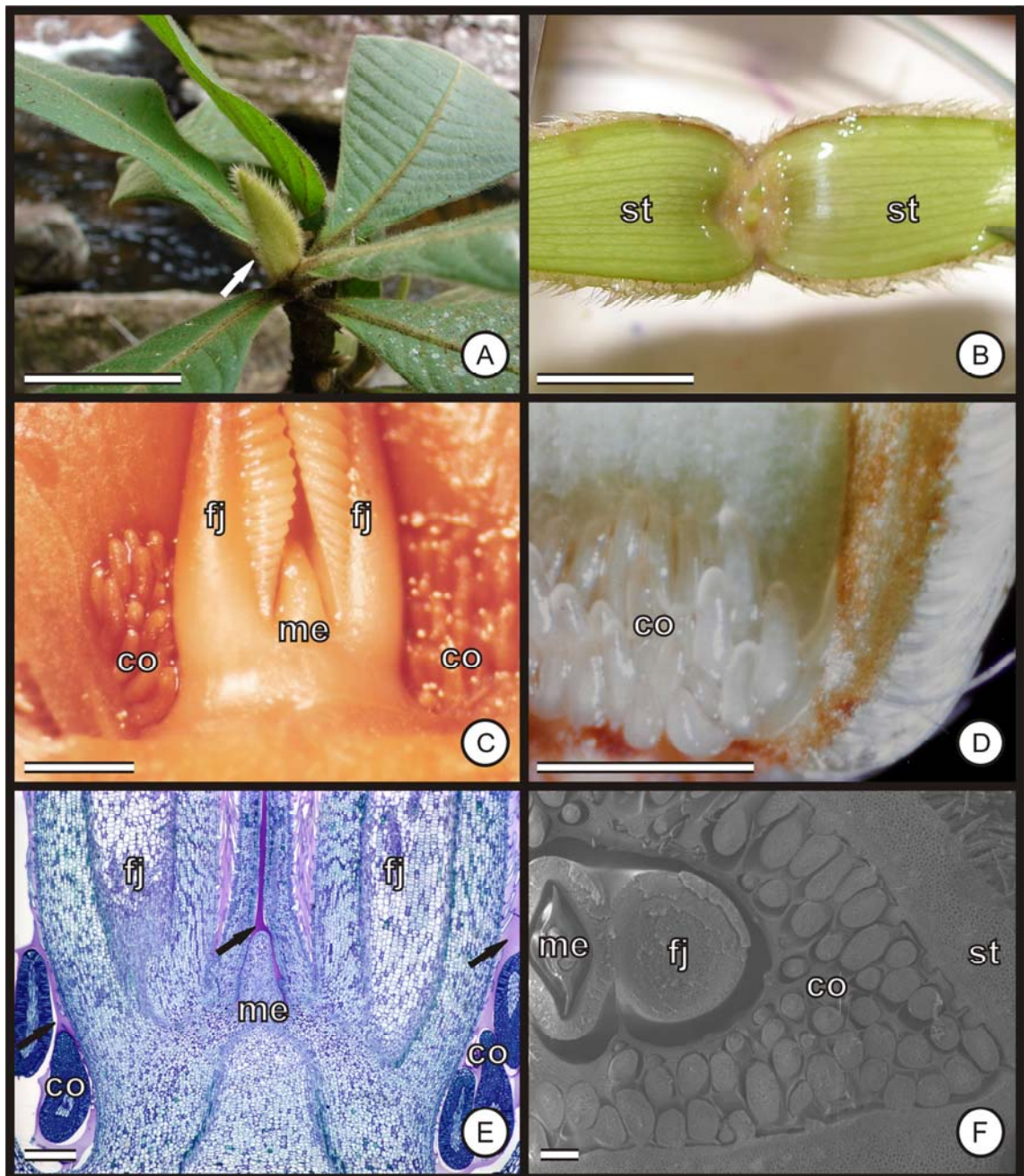


Figura 1A-F. Ápices vegetativos de *Bathysa cuspidata*. A. Porção apical do ramo com estípulas (seta). B. Estípulas abertas evidenciando o acúmulo de secreção esbranquiçada e brilhosa (st). C. Meristema (me) e folhas jovens (fj) circundados por coléteres (co) em material fixado. D. Coléteres em material fresco. E. Secção longitudinal do ápice vegetativo, mostrando o acúmulo de secreção mucilaginosa corada de roxo pelo azul de toluidina (setas). F. Secção transversal do ápice vegetativo mostrando os coléteres circundando as folhas jovens e o meristema. Barra: A-B = 10 mm; C-D = 1 mm; E-F = 200 μ m.

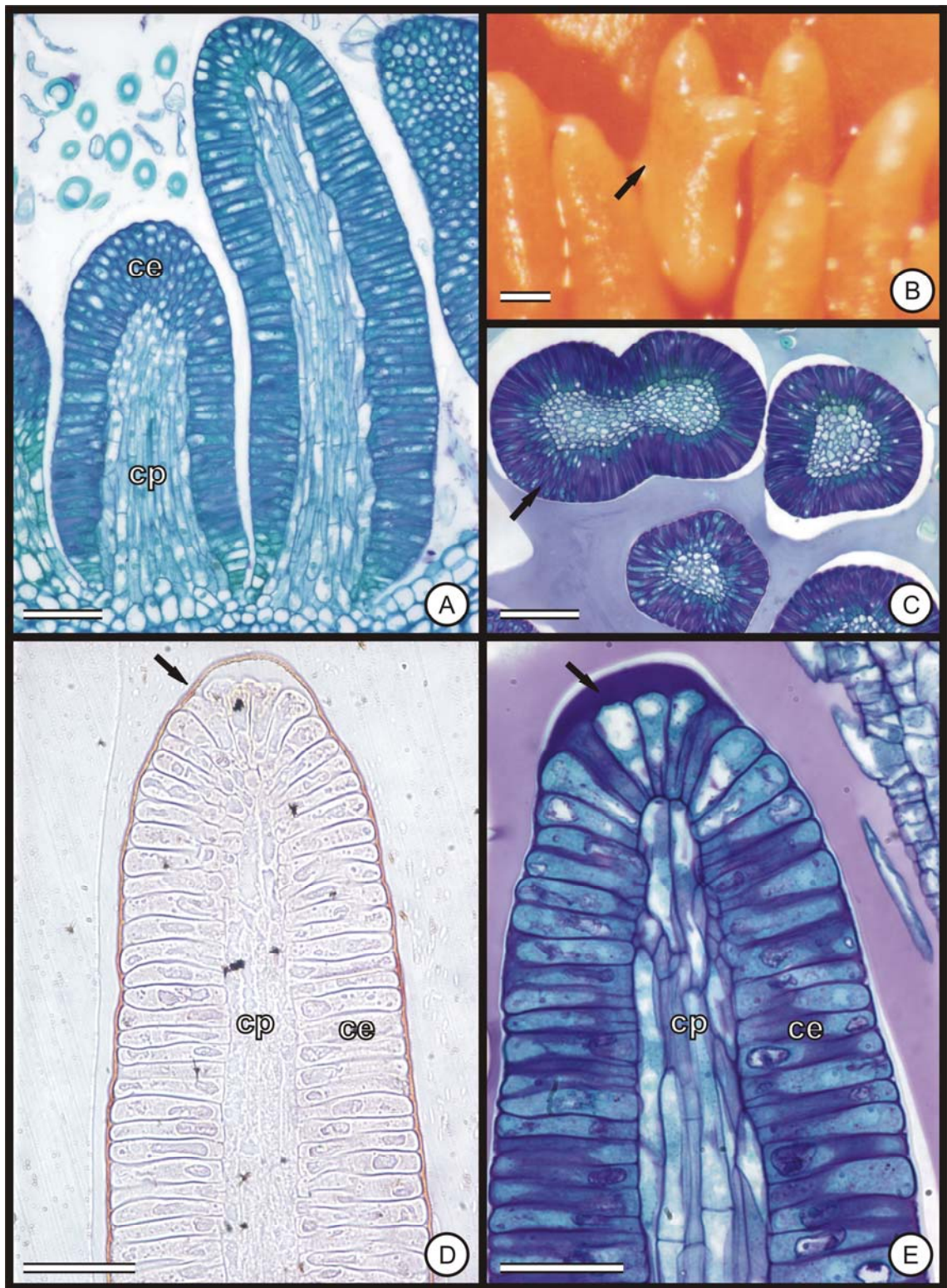


Figura 2A-E. Coléteres de *Bathysa cuspidata*. A. Coléter do tipo padrão, mostrando as células parenquimáticas do eixo axial (cp) e as células epidérmicas (ce). B. Coléter bifurcado em material fixado (seta). C. Secção transversal do coléter bifurcado (seta) e do tipo padrão. D-E. Secção longitudinal do coléter do tipo padrão mostrando a cutícula e o espaço subcuticular (seta), respectivamente. Barra: A-C = 100 μ m; D-E = 50 μ m.

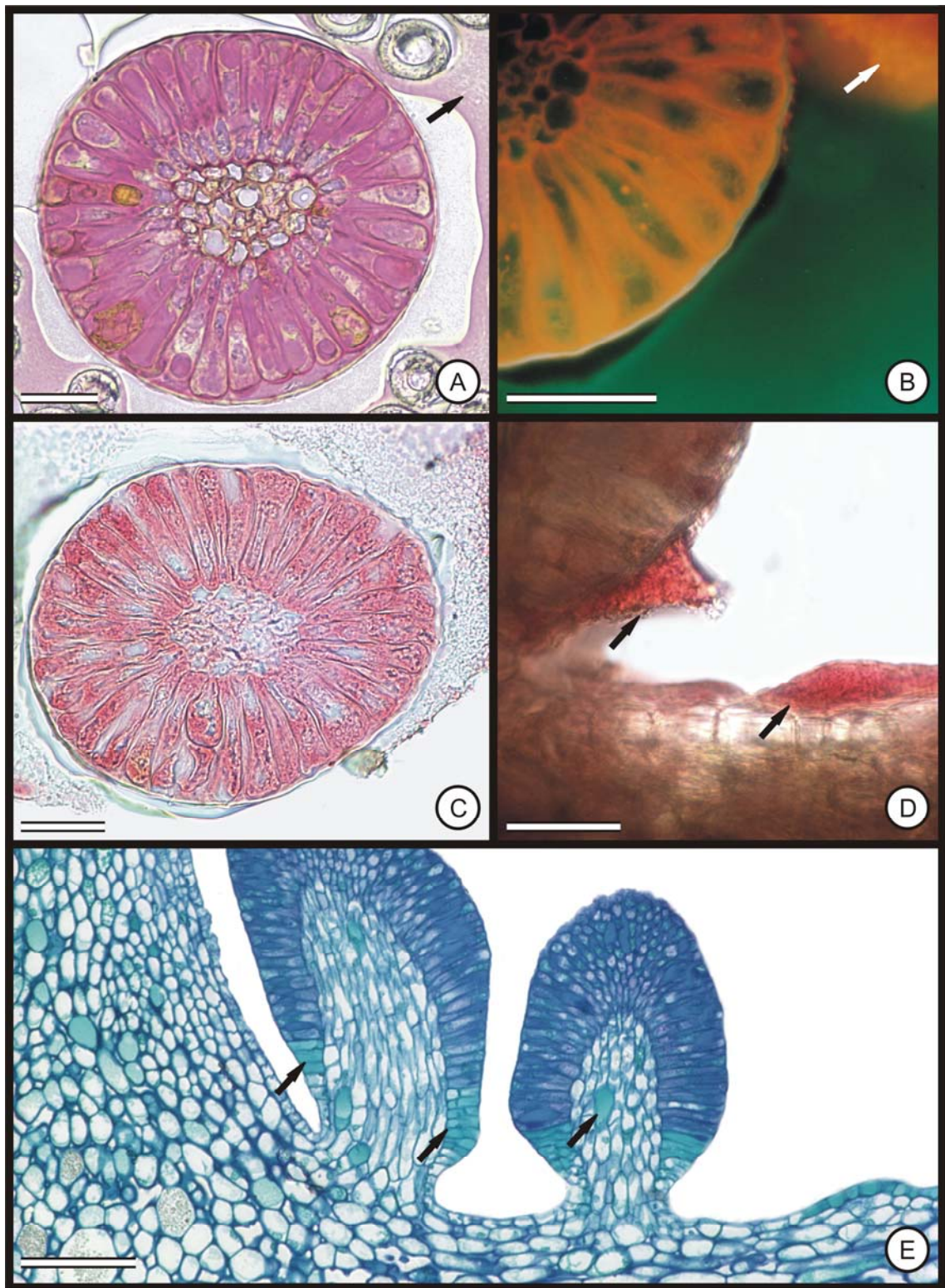


Figura 3A-E. Caracterização histoquímica dos coléteres de *Bathysa cuspidata*. Secções transversais (A-C) e longitudinais (D-E). A. Epitélio secretor e secreção externa (seta) corados de rosa pelo vermelho de rutênio indicando a presença de pectinas. B. Epitélio secretor e secreção externa (seta) com pectinas exibindo fluorescência amarela sob luz UV. C. Coléter corado de vermelho pelo Xylidine Ponceau (XP) indicando a presença de proteínas. D. Secreção externa (seta) corada de vermelho pelo XP. E. Células do epitélio secretor e do eixo axial com conteúdo fenólico corados de verde pelo azul de toluidina (seta). Barra: A-D = 30 μm ; E = 100 μm .

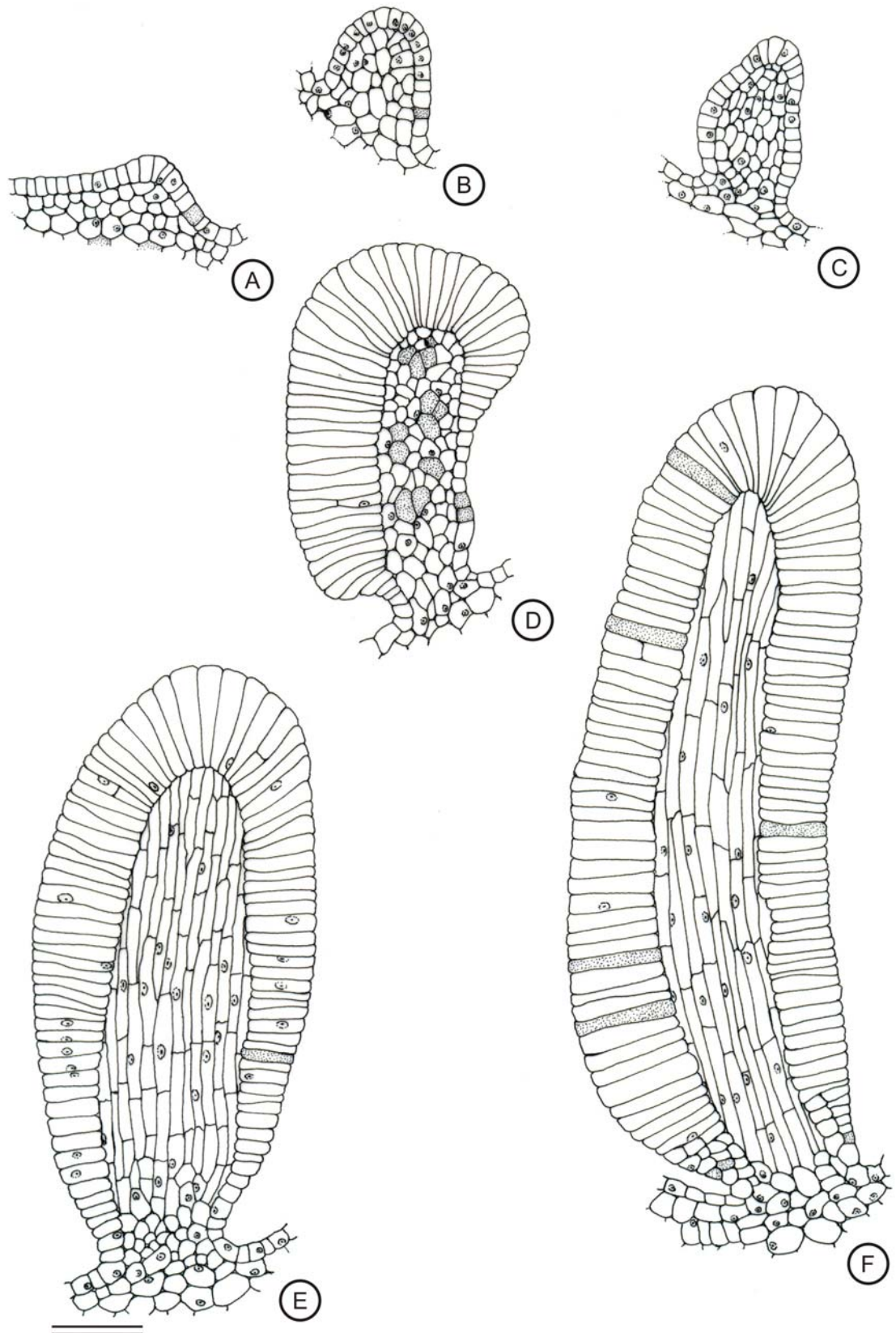


Figura 4A-F. Desenvolvimento dos coléteres em *Bathysa cuspidata*. A. Fase inicial, mostrando a protuberância que corresponde ao primórdio dos coléteres. B. Desenvolvimento do primórdio dos coléteres em forma de cúpula. C. Desenvolvimento do primórdio com constrição na base, mas ainda sem tecidos diferenciados. D. Coléter com diferenciação assimétrica do epitélio secretor. E. Diferenciação do corpo principal. F. Coléter maduro. Barra: A-F = 50 μ m.

Tabela 1: Caracterização histoquímica dos coléteres de *Bathysa cuspidata*.

| Grupo de compostos | Reagente/ corante | Cor | Reação |
|---------------------|---|----------|--------|
| Lipídios | Sudan escarlate | - | - |
| | Sudan black B | - | - |
| Compostos fenólicos | Azul de toluidina | Verde | + |
| Carboidratos | Ácido periódico/ reagente de Schiff (PAS) | Rosa | + |
| | Reagente de Lugol | - | - |
| | Vermelho de Rutênio | Rosa | + |
| | Corifosfina | Amarelo | + |
| Proteínas | Xylidine Ponceau (XP) | Vermelho | + |

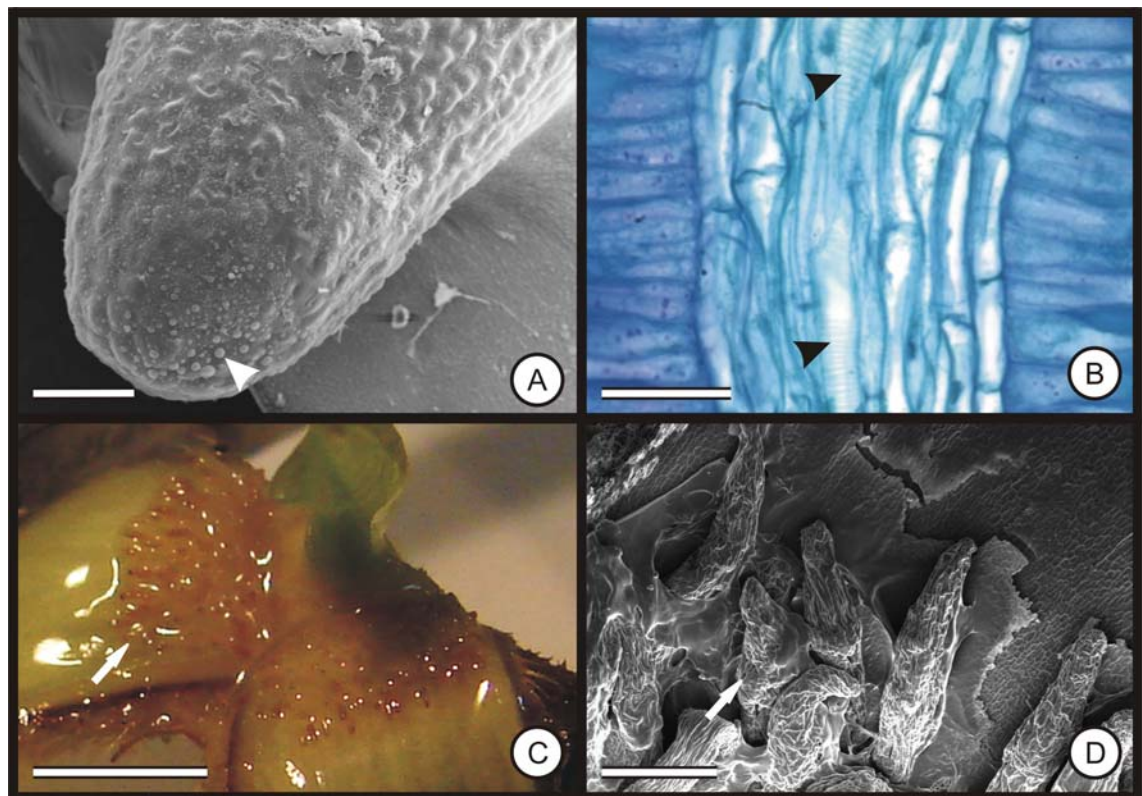


Figura 5A-D. Coléteres de *Bathysa cuspidata*. A. Ápice do coléter com estruturas semelhantes a bolhas (cabeça de seta). B. Traços vasculares (cabeça de seta). C. Coléteres em senescência (seta). D. Coléteres murchos. Barra: A-B = 30 μ m; C = 10 mm; D = 300 μ m.

Discussão

A terminologia tradicionalmente usada para caracterizar os coléteres foi introduzida por Lersten (1974a, 1974b) a partir de estudos com a família Rubiaceae. Segundo esse autor existe um tipo mais comum de coléter chamado de padrão e derivações a partir desse tipo. Thomas (1991) cita as sete morfologias diferentes

encontradas em Rubiaceae, assim denominadas: padrão, padrão reduzido, intermediário, dendróide, escova, alado e filiforme.

Com a ampliação de táxons em estudo verificou-se que nem sempre a terminologia existente era adequada para descrever as novas formas encontradas. Desde então, novos tipos vem sendo criados, como os tipos: séssil, lacrimiforme e trocleariforme descritos para família Turneraceae por González (1998). Simões et al. (2006) também propõem uma classificação para os coléteres calicinais de Apocynaceae, sendo estes divididos em bifurcados, laminares e sésseis. Os coléteres bifurcados das Apocynaceae são idênticos aos do tipo padrão, se diferenciando destes apenas pela divisão da metade superior do corpo principal. Ocorrem em duas espécies de *Mandevilla* com menor frequência que os do tipo padrão e provavelmente se originaram deles através do processo de separação celular. O resultado dessa separação do corpo principal do coléter do tipo padrão para se tornar um coléter bifurcado é interpretada por Simões et al. (2006) como um incremento na área do epitélio secretor.

A maioria dos coléteres de *Bathysa cuspidata* se encaixa no tipo padrão descrito por Lersten (1974a, 1974b) e os coléteres bifurcados seguem o mesmo padrão descrito acima para os coléteres bifurcados de espécies de *Mandevilla* (Simões et al. 2006). Os coléteres bifurcados de *B. cuspidata* estão sendo citados pela primeira vez na família Rubiaceae.

Coléteres vascularizados têm sido reportados em *Strophanthus* e *Funtumia* (Woodson e Moore 1938), *Holarrhena*, *Vallaris* e *Wrightia* (Rao e Ganguli 1963), *Aganosoma* (Dave et al. 1987) e em *Bathysa* (Miguel et al. 2006).

Em *B. cuspidata*, foram encontrados traços vasculares formados apenas de xilema, também relatados para coléteres de *Nerium* e *Aganosma*, e tidos como passo evolutivo entre os coléteres de Apocynaceae (Thomas 1991).

A vascularização dos coléteres sempre está conectada com o órgão onde estão ligados (Thomas 1991). Carlquist (1969) propõe que a vascularização de uma estrutura é diretamente proporcional ao seu tamanho. Entretanto, em espécies de *Mandevilla*, independente do tamanho, os coléteres podem ou não ser vascularizados e a presença de vascularização parece depender da proximidade dessas estruturas com os traços vasculares do órgão onde estão ligados (Apezzato-da-Glória e Estelita 2000). Em *Gardenia*, os feixes vasculares da estípula e do cálice são encontrados muito perto dos coléteres, mas nunca encontrados inteiramente dentro dessas estruturas (Dave et al. 1988). Os coléteres de *B. cuspidata* estão ligados à face adaxial das estípulas, tendo

quase sempre um feixe vascular logo abaixo, corroborando os dados de Apezato-da-Glória e Estelita (2000) e Dave et al. (1988).

O desenvolvimento dos coléteres em *B. cuspidata* segue o mesmo padrão verificado em espécies de *Mandevilla* (Apezato-da-Glória e Estelita 2000), *Caryocar brasiliense* (Paiva e Machado 2006) e *Turnera* (González 1998), sendo considerados emergências, pois tanto a protoderme quanto o meristema fundamental subepidérmico têm participação em sua formação. Algumas divisões periclinais do epitélio secretor formando regiões bisseriadas que também foram observadas em *Coffea* (Patel e Zaveri 1975), *Roupelia* (Thomas et al. 1989) e *Turnera* (González 1998).

Os espaços intercelulares repletos de secreção observados no epitélio secretor dos coléteres de *B. cuspidata* podem estar envolvidos com processos de dissolução da lamela média e conseqüente aceleração do processo de secreção. A dissolução da lamela média ao longo das paredes radiais do epitélio secretor, com a formação de espaços intercelulares e liberação do produto de secreção dentro desses espaços é relatada para espécies de *Mandevilla* e *Plumeria* (Mohan e Inamdar 1986, Apezato-da-Glória e Estelita 2000) e, de acordo com Dave et al. (1988), a formação dessa abertura acelera o processo de secreção.

Alguns trabalhos reportam que a secreção dos coléteres é liberada por ruptura da cutícula (Horner e Lersten 1968, Thomas e Dave 1989). Em *B. cuspidata* observou-se que o distendimento da cutícula forma um espaço subcuticular de armazenamento do secretado, entretanto, não foi observado o rompimento ou poros na cutícula. O rompimento da cutícula também não foi observado em *Bathysa nicholsonii* por Miguel et al. (2006).

Segundo Germano-Filho (1999), as estípulas de *B. cuspidata* são caducas, unidas entre si, caindo logo que os primórdios foliares se expandem. Esse mesmo autor também relata que, quando as folhas jovens se expandem os coléteres secam, caem e são substituídos por tricomas multicelulares não secretores. No presente estudo, verificou-se que a face interna das estípulas não possui tricomas. Os tricomas presentes são foliares, se diferenciam primeiro na face abaxial, ainda nos primórdios foliares, e posteriormente na face adaxial, já na fase de folha jovem. Os tricomas da face abaxial se entremeiam com os coléteres mais próximos, porém não se observou a substituição de coléteres por tricomas. As estípulas encontram-se fechadas no momento mais susceptível do desenvolvimento das folhas e o início do processo de senescência dos coléteres ocorre antes da abertura das estípulas e, conseqüente, antes da exposição das folhas jovens ao ambiente. Tal fato denota que o papel de proteção do meristema e de

órgãos em desenvolvimento atribuído aos coléteres (Thomas 1991, Fahn 1979, Evert 2006, Paiva e Machado 2006) talvez também aconteça para esta espécie, entretanto, são necessários estudos mais específicos que demonstrem tal relação.

Não se verificaram mudanças evidentes no formato ou estrutura dos coléteres de *B. cuspidata* no início do processo de senescência, sendo essa fase marcada pela mudança na coloração original dos coléteres para tons de marrom, ainda com a presença de secreção recobrando o meristema e folhas em desenvolvimento. Após essa fase, a secreção é escassa ou ausente, as estípulas se abrem, os coléteres adquirem uma coloração marrom escuro e murcham, com posterior queda das estípulas. Essa mudança na coloração original dos coléteres foi igualmente relatada para diferentes espécies e está relacionada com a parada da atividade secretora e início do processo de senescência (Thomas 1991, Apezato-da-Glória e Estelita 2000, Barreiro e Machado 2007).

Segundo Thomas (1991), o exsudado do coléter pode ter natureza mucilaginosa ou resinosa e conter proteínas, carboidratos ou ambos. Dos testes histoquímicos realizados nos coléteres de *B. cuspidata* foi possível detectar a presença de compostos fenólicos, polissacarídeos, pectinas e proteínas. A presença dessas substâncias isoladas ou em misturas complexas foi igualmente detectada em coléteres de diversas espécies (Horner e Lersten 1968, Thomas e Dave 1989, Thomas et al. 1989, Thomas e Dave 1990, Apezato-da-Glória e Estelita 2000, Klein et al. 2004). Esse tipo de secreção, formada por mucilagem contendo proteínas, também foi registrada para *Bathysa nicholsonii* e tem sido amplamente relatada para coléteres de várias outras espécies (Fahn 1979, Thomas 1991, Evert 2006).

Conclusões

Os coléteres bifurcados encontrados em *B. cuspidata*, conhecidos apenas das Apocynaceae, estão sendo descritos pela primeira vez para família Rubiaceae e possivelmente ocorrem em outros táxons da família. Não foram observados poros, fendas ou rompimento da cutícula. Contudo pode-se observar o acúmulo de secreção no espaço subcuticular, sendo necessários estudos de ultra-estrutura para elucidação do processo de liberação da secreção pelos coléteres. Sugere-se também a investigação das atividades biológicas da secreção dos coléteres de *B. cuspidata*, tal como realizado em *Bathysa nicholsonii*.

Referências Bibliográficas

- APEZZATO-DA-GLÓRIA B e ESTELITA MEM. 2000. Development, structure and distribution of Colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutino* (Apocynaceae). Rev. brasil. Bot. 23(2): 113-120.
- BARREIRO DP e MACHADO SR. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. Revista Brasileira de Botânica 30(3): 387-399.
- BOTSARIS AS. 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 3: 18.
- BRUNDRETT MC, KENDRICK B e PETERSON CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. Biotechnic & Histochemistry 66:111-116.
- CARLQUIST S. 1969. Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. Phytomorphology 19: 332-362.
- DAVE Y, THOMAS V e KURIACHEN PM. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosoma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19: 243-248.
- DAVE Y, KURIACHEN PM e THOMAS V. 1988. Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). Acta Societatis Botanicorum Polonie 57: 3-7.
- EVERT RF. 2006. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3 ed. New Jersey/Canada: John Wiley & Sons, Inc., 601 p.
- FAHN A. 1979. Secretory tissues in plants. New York, Academic Press. 302 p.
- GERMANO-FILHO P. 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C.Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. Rodriguésia 50(76/77): 49-75.
- GONZÁLEZ AM. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). Botanical Journal of the Linnean Society 128: 215-228.
- HORNER HT e LERSTEN NR. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). American Journal of Botany 55: 1089-1099.

- JENSEN WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 408 p.
- JOHANSEN DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 423p.
- KLEIN DE, GOMES VM, DA SILVA-NETO SJ e DA CUNHA M. 2004. The Structure of Colleters in Several Species of Simira (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733–740.
- LEITE JPV, FERNANDES JM, FÁVARO LB, GONTIJO DC, MAROTTA CPB, SIQUEIRA LC, MAIA RT e GARCIA FCP. 2008. Plantas medicinais do entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG BIOTA* 1(4): 16-34.
- LEONI LS. 1995. Fitoterapia no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG. *Pabstia* 7(1): 1-5.
- LERSTEN NR. 1974a. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 69: 125–136.
- LERSTEN NR. 1974b. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973–981.
- LERSTEN NR. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71: 311–319.
- MAIA V. 1979. Técnica histológica. São Paulo: Atheneu, 298p.
- MIGUEL EC, GOMES VM, DE OLIVEIRA MA e DA CUNHA M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, Secretion Protein Composition, and Antifungal Activity. *Plant Biology* 8: 715–722.
- MOHAN JSS e INAMDAR JA. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57: 389-401.
- O'BRIEN TP, FEDER N e MCCULLY ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- PAIVA EAS e MACHADO SR. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Braz. J. Biol.* 66 (1B): 301-308.

- PATEL JD e ZAVERI M. 1975. Development of leaf and stipular glands in *Coffea arabica*. *Flora* 164: 11-18.
- PEARSE AGE. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. vol. 2. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- RAO VS e GANGULI A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42: 419-435.
- SIMÕES AO, CASTRO MM e KINOSHITA LS. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 387–398.
- THOMAS V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS V e DAVE Y. 1989. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64: 201-203.
- THOMAS V e DAVE Y. 1990. Structure and necrosis of stipular colleters in *Myrtagyna parvifolia* (Rubiaceae). *Balgian Journal of Botany* 123: 67-72.
- THOMAS V, DAVE Y e MENON ARS. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8: 493-496.
- UEDA K e YOSHIOKA S. 1976. Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *J. Cell. Sci.* 21: 617-631.
- VIDAL BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Ann. Histochem.* 15: 289-296.
- WOODSON RE JR e MOORE JA. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-166.