

CRISTINA RIBEIRO MARINHO

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS E ONTOGENIA DE IDIOBLASTOS DA FOLHA DE *Pothomorphe
umbellata* (L.) MIQ. (PIPERACEAE)**

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

2008

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

T

M338c
2008

Marinho, Cristina Ribeiro, 1981-

Características anatômicas, histoquímica das estruturas secretoras e ontogenia de idioblastos da folha de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) / Cristina Ribeiro Marinho. – Viçosa, MG, 2008. viii, 59f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

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

1. Pariparoba - Anatomia. 2. Pariparoba - Histoquímica.
3. Pariparoba - Ontogenia. 4. *Pothomorphe umbellata*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

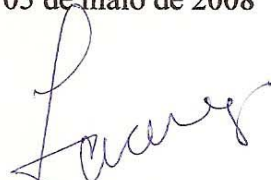
CDD 22.ed. 583.25

CRISTINA RIBEIRO MARINHO

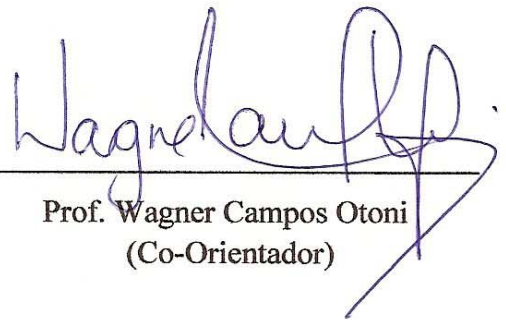
**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS E ONTOGENIA DE IDIOBLASTOS DA FOLHA DE *Pothomorphe
umbellata* (L.) MIQ. (PIPERACEAE)**

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: 05 de maio de 2008



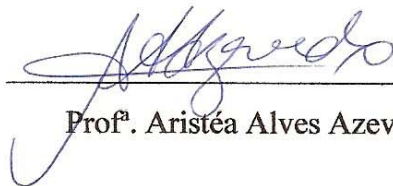
Prof. Adilson Ariza Zacaro
(Co-Orientador)



Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)



Prof. Élder Antônio Sousa e Paiva



Prof.ª Aristéa Alves Azevedo



Prof.ª Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

*Aos meus pais Luis Carlos e
Rosa. Sem eles eu jamais poderia
ter concluído esse sonho.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por ter aberto as portas para que este meu sonho pudesse ser concretizado.

À professora Marília Contin Ventrella, pela orientação.

Aos meus co-orientadores Adilson Ariza Zacaro e Wagner Campos Otoni.

À minha amiga e colega de “república” Marina, que me ajudou tanto e se preocupou comigo mais que qualquer um.

Ao Advanio, por ter agüado minhas plantinhas na UCP quando eu não estava em Viçosa.

À Leonor, por ter me ajudado na coleta de minhas “filhas”.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Bruno, Advanio, Josi, Patrícia, Vitor, Leonor, Kellen, Jaque, Diogo, Bárbara, Diego, Letícia, Naiara, Dudu, Tuane e Thiago, pelas conversas durante as eternas trocas de álcool.

A todos os professores, colegas e amigos do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal.

Aos membros da banca Élder Sousa e Paiva e Aristéa Alves Azevedo.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela estrutura, material e equipamentos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise pelas lindas imagens de varredura obtidas.

À Unidade de Crescimento de Plantas por ter abrigado minhas plantinhas.

À minha família, que eu tanto amo. Pai, mãe e meus irmãos.

Por fim, agradeço a Deus, por permitir que as coisas aconteçam e por colocar pessoas especiais em meu caminho.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: Aspectos anatômicos da folha de <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.)	
Miq. (Piperaceae) e histoquímica das estruturas secretoras	7
Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	23
Conclusões	30
Referências Bibliográficas	31
CAPÍTULO 2: Ontogenia dos idioblastos secretores presentes no limbo foliar	
de <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq. (Piperaceae)	38
Resumo	38
Abstract	39
Introdução	40
Material e Métodos	42
Resultados	44
Discussão	51
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	55
CONCLUSÕES GERAIS	59

RESUMO

MARINHO, Cristina Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2008.
Características anatômicas, histoquímica das estruturas secretoras e ontogenia de idioblastos da folha de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae).
Orientadora: Marília Contin Ventrella. Co-Orientadores: Adilson Ariza Zacaro e Wagner Campos Otoni.

Pothomorphe umbellata, conhecida popularmente como pariparoba ou capeba, ocorre em ambientes úmidos e é utilizada em quase todo o Brasil por suas propriedades medicinais. Os objetivos desse trabalho foram conhecer a anatomia foliar de *P. umbellata*, realizar a caracterização histoquímica das estruturas secretoras presentes e descrever a ontogenia dos seus idioblastos secretores. Para a caracterização estrutural, porções foliares foram fixadas em FAA₅₀ e estocadas em etanol 70%. Para o estudo da ontogenia dos idioblastos, primórdios foliares e porções da região mediana do limbo foliar, em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,0. Independente do tipo de fixador utilizado, as amostras foram desidratadas em série etílica, incluídas em metacrilato, cortadas em micrótomo rotativo com 5µm de espessura, coradas com azul de toluidina e montadas sob lamínula com resina sintética. A diafanização foi utilizada para o estudo de superfície e avaliação da densidade de idioblastos. Para a caracterização micromorfológica da folha, amostras de primórdios foliares e de folhas, em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixadas em FAA₅₀, estocadas em etanol 70% e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Para a análise histoquímica das estruturas secretoras, folhas frescas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa e submetidas a diversos corantes e reagentes. A folha de *P. umbellata* apresenta epiderme e cutícula delgadas, é hipoestomática, dorsiventral e tem tecido de sustentação restrito às calotas de colênquima. Os idioblastos têm secreção mista, os quais apresentam compostos hidrofóbicos (oleorresinas) e hidrofílicos (fenólicos e alcalóides). Nos tricomas secretores, a secreção é composta predominantemente de flavonóides. Nos feixes vasculares das nervuras e do pecíolo são observados elementos de

protoxilema colapsados, que acumulam mucilagem. Um grande canal mucilaginoso é observado na medula do pecíolo. Os idioblastos presentes na região das nervuras de maior calibre desenvolvem-se precocemente, tanto a partir do meristema fundamental como da protoderme. Na região intervenal, os idioblastos originam-se apenas a partir de iniciais da protoderme. Em ambas as regiões, as iniciais dos idioblastos se distinguem das demais células do tecido pelo seu tamanho avantajado, citoplasma vacuolado e presença de núcleo e nucléolo mais conspícuos. A secreção do idioblasto é mantida na folha desde sua origem até sua senescência, o que sugere para essa estrutura um papel de defesa química ao longo de toda a vida foliar. A falta de resistência mecânica nesta espécie é compensada pelas defesas químicas, representada pelas estruturas secretoras e seus metabólitos secretados.

ABSTRACT

MARINHO, Cristina Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2008.
Anatomical characteristics, histochemistry of the secretory structures and ontogeny of idioblasts on the leaf of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae). Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: Adilson Ariza Zacaro and Wagner Campos Otoni.

Pothomorphe umbellata, commonly known as *pariparoba* or *capeba*, occurs in humid environments and is used in almost entire Brazil due to its medicinal properties. The goals of this work were to understand the leaf anatomy of *P. umbellata*, to perform the histochemical characterization of the secretory structures present, and to describe the ontogeny of its secretory idioblasts. Regarding the structural characterization, leaf portions were fixed in FAA₅₀ and stored in 70% ethanol. In respect to the study of the idioblast's ontogeny, leaf primordia from the middle portions of the leaf limb, under different developmental stages, were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. Independently of the type of fixer used, the samples were dehydrated in ethylic series, included in methacrylate, and sliced in rotary microtome with 5µm of width, stained with Toluidine Blue, and mounted in coverslip with synthetic resin. The diaphanization was used in the surface study and assessment of the density of the idioblasts. For the leaf micromorphological characterization, samples of leaf primordia, under different developmental stage, were fixed in FAA₅₀, stored in 70% ethanol, and processed for scanning electron microscopy. Concerning the histochemical analysis of the secretory structures, fresh leaves were transversally sectioned and submitted to several dyes and reagents. The leaf of *P. umbellata* presents thin epidermis and cuticle; it is hypostomatic, dorsiventral and presents supporting tissue restricted to the discontinuous strands of collenchyma. The idioblasts have mixed secretion, which present hydrophobic compounds (oleoresins) and hydrophilic compounds (phenolics and alkaloids). In the secretory trichomes, the secretion is comprised of flavonoids, predominantly. In the vascular bundles of the veins and petiole, there are noticed collapsed elements of the

protoxylem, which accumulate mucilage. A large mucilaginous duct is observed in the petiole's medulla. The idioblasts present in the region of the veins of larger caliber were developed precociously from the fundamental meristem as well as from the protodermis. In the interveinal region, the idioblasts are originated from initials of the protodermis. At both regions, the idioblasts initials stand out from the other cells of the tissue by their large size, vacuolated cytoplasm, and presence of nucleus and nucleolus more conspicuous. The secretion of the idioblasts is kept in the leaf since the beginning until the leaf's senescence, what suggests to this structure a role of chemical defence along the leaf's life. The chemical defence, represented by the secretory structures and its secreted metabolites, compensates the lack of mechanical resistance in this species.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Piperaceae é pantropical, com representantes desde herbáceos a arbóreos, incluindo também algumas espécies epífitas (Cronquist 1981, Judd *et al.* 2002). A família consiste de cerca de 10 gêneros e um número grande mas incerto de espécies, as quais variam de 1400 a mais de 2000. A maioria das espécies dessa família pertence aos gêneros *Peperomia* e *Piper*; entretanto, o gênero *Piper* atualmente tem sido subdividido em vários subgêneros por diversos autores (Cronquist 1981). No Brasil, é representada pelos gêneros *Pothomorphe*, *Sarcorrhachis*, *Peperomia*, *Piper* e *Ottonia*, os quais abrangem um total aproximado de 460 espécies (Barroso *et al.* 2004).

Com exceção do gênero *Symbryon*, os membros dessa família são distintos por possuírem células secretoras com conteúdos de natureza oleosa, os quais podem ser translúcidos ou não. As folhas, sempre hipostomáticas, normalmente apresentam tricomas como pêlos tectores unisseriados, pequenos pêlos glandulares e glândulas peroladas unicelulares decíduas, estando estas presentes somente no gênero *Piper*. Outras características anatômicas presentes nas folhas utilizadas na diagnose dessa família são: a presença de cristais de oxalato de cálcio aciculares ou em forma de areia, hipoderme voltada para superfície adaxial, células epidérmicas silicificadas e epiderme papilosa (Solereeder 1908, Metcalfe & Chalk 1950).

O gênero *Pothomorphe* foi estabelecido por Miquel (1840) utilizando como base as espécies *Piper umbellatum* e *Piper peltatum*, juntamente com outras espécies descritas por Linnaeus (1753) (Boza 1998). Em uma revisão do gênero, Boza (1998) reconhece *Pothomorphe* Miq. como um gênero distinto de *Piper* L. pela presença de inflorescências compostas axilares às folhas e pelo hábito subarborescente; ao contrário do gênero *Piper*, cujas inflorescências são simples, terminais e opostas às folhas, e cujo hábito é arbustivo a arbóreo. No Brasil, ocorrem somente duas espécies de *Pothomorphe*, *P. umbellata* (L.) Miq. e *P.*

peltata (L.) Miq., que se diferenciam macroscopicamente pela presença de folhas peltadas em *P. peltata* (Yuncker 1973).

Pothomorphe umbellata (figura 1), um subarbusto perene, é conhecido popularmente como pariparoba ou capeba e utilizado em quase todo o Brasil por suas propriedades medicinais. Suas folhas e raízes são utilizadas na forma de chás, decotos, xaropes e cataplasmas (Freise 1933, Moraes 1986, Lorenzi & Matos 2002). Entre as indicações populares e científicas para o uso desta espécie pode-se citar diferentes efeitos, tais como diurético (Fouqué 1980, Moraes 1986), antiepilético (Pereira *et al.* 1996) e antiofídico (Pereira *et al.* 1996, Mors *et al.* 2000). O uso da espécie também é recomendado na medicina popular para dores musculares, problemas hepáticos (Di Stasi *et al.* 2002), inchaços e inflamações nas pernas, eripsela, filariose, febre, afecções das vias respiratórias, queimaduras leves, dor de cabeça, reumatismo e malária (Lorenzi & Matos 2002).

No geral, os princípios ativos encontrados em plantas medicinais ocorrem em estruturas secretoras especializadas (Fahn 1979, Svoboda *et al.* 1998/1999). Estas são de grande importância na farmacognosia, podendo servir como caráter diagnóstico, para confirmar ou não a autenticidade do material vegetal (Oliveira *et al.* 1998). Além disso, as estruturas secretoras constituem os sítios de produção e, ou acúmulo de princípios ativos (Fahn 1979, Mauseth 1988, Evert 2006), largamente utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e de perfumaria.

O tipo de estrutura secretora e a sua frequência também podem estar relacionados com a quantidade e a qualidade de substâncias produzidas por determinada espécie. Assim, vários autores, mediante estudos com microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, aliados a testes histoquímicos, puderam associar a composição química de metabólitos produzidos a diferentes estruturas secretoras em diversas famílias de plantas (Zobel 1986, Platt & Thomson 1992, Ferreira & Janick 1995, Fahn & Shimony 1996, Ascensão *et al.* 1997, Ascensão *et al.* 1999, Kolbi & Müller 2004, Machado *et al.* 2006).

Da mesma maneira, a ontogenia de estruturas secretoras pode fornecer dados para esclarecer o processo de desenvolvimento dessas estruturas, bem como evidenciar o processo de síntese e secreção dos compostos produzidos (Ascensão & Pais 1987, Mariani *et al.* 1989, Silva & Machado 1999, Monteiro *et al.* 2001, Ciccarelli *et al.* 2001, Kalachanis & Psaras 2005, Moura *et al.* 2005, Liang *et al.* 2006).

Diante do exposto, este trabalho possui como objetivos conhecer a anatomia foliar de *P. umbellata*, realizar a caracterização histoquímica das estruturas secretoras e verificar a ontogenia dos seus idioblastos.

O trabalho foi redigido na forma de dois capítulos, os quais foram intitulados como: “Aspectos anatômicos da folha de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) e histoquímica das estruturas secretoras” e “Ontogenia dos idioblastos secretores presentes no limbo foliar de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae)”.



Figura 1: Indivíduo de *P. umbellata* naturalmente crescendo em ambiente sombreado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascensão L, Pais MSS. 1987.** Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette* **148**(2):221-227.
- Ascensão L, Marques N, Pais MS. 1997.** Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Sciences* **158**:249-258.
- Ascensão L, Mota L, Castro MM. 1999.** Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* **84**:437-447.
- Barroso GM, Peixoto AL, Ichaso CLF, Guimarães EF, Costa CG. 2004.** *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. v.1. 2.ed. Viçosa: Editora UFV.
- Boza HS. 1998.** Revisión del género *Pothomorphe* Miq. (Piperaceae) en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* **19**:41-44.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 2001.** Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**:637-644.
- Cronquist A. 1981.** *An integrated system of classification of flowering plants*. 2.ed. New York: Columbia Univ. Press.
- Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS. 2002.** Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**:69-91.
- 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.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A, Shimony C. 1996.** Glandular trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials. *Annals of Botany* **77**:25-34.
- Ferreira JFS, Janick J. 1995.** Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences* **156**(6):807-15.
- Fouqué A. 1980.** Les plantes médicinales présentes en Forêt Guyanaise. *Fruits* **35**(12):759-768.
- Freise FW. 1933.** Plantas medicinais brasileiras. *Boletim de Agricultura. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo* **34** (único):428.

- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 2002.** *Plants systematics: a phylogenetic approach*. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Kalachanis D, Psaras GK. 2005.** Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. *Biologia Plantarum* **49**(1):105-110.
- Kolbi D, Müller M. 2004.** Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Curcubita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany* **94**:515-526.
- Liang S, Wu H, Lun X, Lu D. 2006.** Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**(5):573-583.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002.** *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Machado SR, Gregório EA, Guimarães E. 2006.** Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* **97**:357-369.
- Mariani P, Cappelletti EM, Campoccia D, Baldan B. 1989.** Oil cell ultrastructure and development in *Liriodendron tulipifera* L. *Botanical Gazette* **150**(4):391-396.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*. Menlo Park/California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Monteiro WR, Castro MM, Mazzoni-Viveiros SC, Mahlberg PG. 2001.** Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica* **24**(3):349-357.
- Moraes MS. 1986.** Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **1**(1):101-108.
- Mors WB, Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira NA. 2000.** Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* **55**:627-642.
- Moura MZD, Isaias RMS, Soares GLG. 2005.** Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**:427-431.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. 1998.** *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu.
- Pereira NA, Jaccoud RJS, Mors WB. 1996.** Triaga Brasilica: renewed interest in a seventeenth-century panacea. *Toxicon* **14**(5):511-516.

- Platt KA, Thomson WW. 1992.** Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry and biochemistry. *International Journal of Plant Sciences* **153**(3):301-310.
- Silva EMJ, Machado SR. 1999.** Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **22**(2):117-124.
- Solereeder H. 1908.** *Systematic Anatomy of the Dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Svoboda K, Hampson J, Hunter T. 1998/1999.** Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. *The International Journal of Aromatherapy* **9**(3):124-131.
- Yuncker TG. 1973.** The Piperaceae of Brazil II: *Piper* – Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* **3**:29-284.
- Zobel AM. 1986.** Localization of phenolic compounds in tannin-secreting cells from *Sambucus racemosa* L. Shoots. *Annals of Botany* **57**:801-810.

CAPÍTULO 1

Aspectos anatômicos da folha de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) e histoquímica das estruturas secretoras

RESUMO – *Pothomorphe umbellata*, conhecida popularmente como pariparoba ou capeba, é utilizada na medicina popular em quase todo o Brasil. Este trabalho teve como objetivos estudar a anatomia e a micromorfologia foliar de *P. umbellata* e caracterizar histoquimicamente suas estruturas secretoras. Para a caracterização estrutural, porções da folha foram fixadas em FAA₅₀ e estocadas em etanol 70%, para posterior inclusão em metacrilato. O material, depois de cortado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo (5µm), foi corado com azul de toluidina e montado sob lamínula com resina sintética. A diafanização foi utilizada para o estudo de superfície e determinação da densidade de idioblastos. Para a caracterização micromorfológica da folha, amostras foram fixadas em FAA₅₀ e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Para a análise histoquímica, folhas frescas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa e os cortes foram submetidos a diversos corantes e reagentes. A folha de *P. umbellata* tem epiderme e cutícula delgadas, é hipoestomática, dorsiventral, e tem pouco tecido de sustentação, restrito às calotas de colênquima. Os idioblastos apresentam secreção mista, formada por compostos hidrofóbicos (oleorresinas) e hidrofílicos (fenólicos e alcalóides). Nos tricomas secretores, a secreção é composta de flavonóides. Nos feixes vasculares das nervuras e do pecíolo são observados elementos do protoxilema colapsados, que acumulam mucilagem. Um grande canal mucilaginoso é observado na medula do pecíolo. A falta de resistência mecânica nesta espécie é compensada pelas defesas químicas, representada pelas estruturas secretoras e suas secreções, o que, provavelmente, justifica sua diversa atividade terapêutica.

ABSTRACT – Anatomical aspects of the leaf of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) and histochemistry of the secretory structures. *Pothomorphe umbellata*, commonly known as *pariparoba* or *capeba*, is used in the popular medicine in almost entire Brazil. This work aimed at the study of the leaf anatomy and micromorphology of *P. umbellata* and characterization of its secretory structures. Regarding the structural characterization, leaf portions were fixed in FAA₅₀ and stored in placed in 70% ethanol for further inclusion in methacrylate. The material, after transversally and longitudinally sliced (5 µm wide) in rotary microtome, it was stained with Toluidine Blue and mounted under coverslip with synthetic resin. The diaphanization was used for the surface study and determination of the density of the idioblasts. Concerning the morphological characterization of the leaf, samples where fixed in FAA₅₀ and processed for scanning electron microscopy. In respect to the histochemical analysis, fresh leaves were transversally sectioned and the slices were submitted to several dyes and reagents. The leaf of *P. umbellata* presents thin epidermis and cuticle, it is hypostomatic, dorsiventral, and has little supporting tissue, restricted to the discontinuous strands of collenchyma. The idioblasts present mixed secretion, composed of hydrophobic compounds (oleoresins) and hydrophilic compounds (phenolics and alkaloids). In the secretory trichomes, the secretion is composed of flavonoids. In the vascular bundles of the veins and petiole, there are noticed collapsed elements of the protoxylem, which accumulate mucilage. A large mucilaginous duct is noticed in the petiole's medulla. The absence of mechanical resistance in this species is compensated by the chemical defences, represented by the secretory structures and their secretions, what, probably, justifies its several therapeutic uses.

Introdução

O gênero *Pothomorphe* foi estabelecido por Miquel (1840) utilizando como base as espécies *Piper umbellatum* e *Piper peltatum*, juntamente com outras espécies descritas por Linnaeus (1753) (Boza 1998). No Brasil, ocorrem somente duas espécies de *Pothomorphe*, *P. umbellata* (L.) Miq. e *P. peltata* (L.) Miq., as quais diferenciam-se macroscopicamente pela presença de folhas peltadas em *P. peltata* (Yuncker 1973).

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. é um subarbusto ereto, perene e mede, quando adulto, de 1 a 1,5m de altura por 2,5 a 3,5cm de diâmetro na base (Moraes *et al.* 1985, Moraes 1986, Lorenzi & Matos 2002). As folhas, de consistência membranácea, são arredondadas, rugosas, com margens lisas, ápice subagudo e base cordiforme. Os limbos foliares, salpicados de pontos translúcidos granulados, medem de 20 a 25 cm de largura por 18 a 20 cm de comprimento. O pecíolo é sulcado longitudinalmente terminando em bainha alargada, que envolve o nó (Moraes 1986/1987, Yuncker 1973). Nativa de quase todo o Brasil, a espécie ocorre principalmente em locais úmidos, sombreados e ricos de húmus, desde a Amazônia até a região sul do Brasil (Moraes 1986).

Conhecida popularmente como pariparoba ou capeba, *P. umbellata* é utilizada em quase todo o Brasil por suas propriedades medicinais. Suas folhas e raízes são utilizadas na forma de chás, decotos, xaropes e cataplasmas (Freise 1933, Moraes 1986, Lorenzi & Matos 2002). Entre as indicações populares e científicas para o uso desta espécie pode-se citar diferentes efeitos, tais como diurético (Fouqué 1980, Moraes 1986), antiepilético (Pereira *et al.* 1996) e antiofídico (Pereira *et al.* 1996, Mors *et al.* 2000). O uso da espécie também é recomendado na medicina popular para dores musculares, problemas hepáticos (Di Stasi *et al.* 2002), inchaços e inflamações nas pernas, eripisela, filariose, febre, afecções das vias respiratórias, queimaduras leves, dor de cabeça, reumatismo e malária (Lorenzi & Matos 2002).

Vários estudos farmacológicos já confirmaram algumas de suas propriedades medicinais. Ensaio realizado com ratos e *in vitro* confirmam que suas folhas apresentam atividade antimalárica tanto sobre o *Plasmodium berghei* (Amorim *et al.* 1988, Ferreira-da-Cruz *et al.* 2000) como sobre o *P. falciparum* (Adami *et al.* 1998, Atindehou *et al.* 2004). Também foi comprovado que as folhas de *P. umbellata* têm grande potencial no tratamento contra a doença do sono, a qual é desencadeada pelo parasita *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Atindehou *et al.* 2004). Outros estudos demonstraram que as folhas dessa espécie apresentam atividade contra a *Leishmania amazonensis*, um dos agentes causadores da leishmaniose, além de possuírem atividades antifúngicas (Braga *et al.* 2007). As propriedades antiinflamatórias e analgésicas das folhas da *P. umbellata* também já foram comprovadas, reforçando seu uso popular no tratamento de distúrbios inflamatórios (Perazzo *et al.* 2005).

Os princípios ativos das plantas medicinais, geralmente são encontrados nas secreções de estruturas secretoras especializadas (Fahn 1979, Svoboda *et al.* 1998/1999). Estas estruturas secretoras são de grande importância na farmacognosia, podendo servir como caráter diagnóstico, confirmando ou não a autenticidade do material vegetal (Oliveira *et al.* 1998). Além desse aspecto, as estruturas secretoras constituem os sítios de produção e, ou acúmulo de princípios ativos (Fahn 1979, Mauseth 1988, Evert 2006), os quais são largamente utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e de perfumaria.

Entretanto, o tipo de estrutura secretora e a sua frequência podem estar relacionados com a quantidade e a qualidade de substâncias produzidas em uma determinada espécie. Assim, vários autores, mediante estudos com microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, aliados a testes histoquímicos, puderam associar a composição química da secreção a diferentes estruturas secretoras em diversas famílias de plantas (Platt & Thomson 1992, Ferreira & Janick 1995, Fahn & Shimony 1996, Ascensão *et al.* 1997, Ascensão *et al.* 1999, Moraes 1999, Kolbi & Müller 2004, Machado *et al.* 2006).

Assim como outras plantas consideradas medicinais, *P. umbellata* apresenta estruturas secretoras que produzem e acumulam princípios ativos. Há relatos de quatro tipos de estruturas secretoras presentes nas folhas de *P. umbellata*: tricomas secretores, glândulas peroladas, canais e idioblastos. Nesta espécie, os idioblastos estão presentes em todo o corpo vegetativo (Moraes *et al.* 1985, Moraes *et al.* 1986/1987). Entretanto, trabalhos detalhados relacionados à histoquímica dessas estruturas não foram encontrados na literatura.

De acordo com a literatura, não há consenso sobre a anatomia da folha de *P. umbellata* (Moraes *et al.* 1986/1987, Moraes 1999), pois algumas contradições são encontradas, principalmente no que diz respeito à localização e distribuição dos tricomas tectores e ocorrência de glândulas peroladas. Além disso, a descrição dos idioblastos presentes na folha dessa espécie necessita ser melhor detalhada, como afirma Moraes (1999) ao comparar a anatomia foliar de *Pothomorphe peltata* e *P. umbellata*.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivos estudar a anatomia e a micromorfologia foliar de *P. umbellata* e caracterizar histoquimicamente as estruturas secretoras presentes.

Material e Métodos

Material vegetal

Mudas de 30 a 60cm de altura de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. foram coletadas de uma área de cultivo de plantas medicinais localizada no bairro Violeira em Viçosa, Minas Gerais e transplantadas para vasos plásticos contendo terra e areia numa proporção de 3:1. As mudas foram mantidas sob sombrite com 35% de cobertura na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, com a referência VIC 30.218.

Microscopia de luz

Para a caracterização anatômica da folha completamente expandida, amostras da região mediana do limbo e das regiões basal, mediana e apical do pecíolo correspondentes à folha do terceiro nó foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940), para posterior inclusão em metacrilato (Historesin – Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi cortado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com 5µm de espessura, e corado com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permount). Para se verificar a presença de tricomas e glândulas caducas, folhas jovens e primórdios foliares também foram processados pela mesma metodologia.

Para o estudo das células epidérmicas e determinação da densidade de idioblastos presentes no limbo, folhas expandidas foram diafanizadas, coradas com violeta cristal 1%, desidratadas em série alcoólica/xilólica crescente e montadas em resina sintética (Permount). A densidade dos idioblastos foi determinada em câmara clara, utilizando-se objetiva 10. Para cada repetição (n = 3), foi considerada a média de 10 campos de 1mm² cada.

Para os testes histoquímicos, amostras frescas da região mediana do limbo foliar e do pecíolo foram seccionadas em micrótomo de mesa. As seções transversais foram submetidas a diferentes corantes e reagentes: sudan III (Johansen 1940), 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, tetróxido de ósmio (Ganter & Jollés 1969/1970) para lipídios insaturados, reagente de Nadi (David & Carde 1964) para óleos essenciais e oleorresinas, tricloreto de antimônio (Hardman & Sofowora 1972, Mace *et al.* 1974) para esteróides, ácido sulfúrico (Geissman & Griffin 1971) e reação modificada de Abraham (Caniato *et al.* 1989) para lactonas sesquiterpênicas, 2,4-dinitrofenilhidrazina (Ganter & Jollés 1969/1970) para terpenóides com grupo carbonilo, cloreto de ferro III (Johansen 1940) e dicromato de potássio (Gabe 1968) para compostos fenólicos gerais, vanilina clorídrica (Mace

& Howell 1974) para taninos, floroglucina (Jensen 1962) para ligninas, reagente de Wagner (Furr & Mahlberg 1981) e reagente de Dittmar (Furr & 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 pécnicas, azul de Alciano (Pearse 1980) para mucopolissacarídeos ácidos, xylidine ponceau (Vidal 1977) para proteínas totais. Cortes de material incluído em metacrilato também foram utilizados nos testes histoquímicos nos canais.

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 a 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 o estudo em microscopia de fluorescência, o material foi tratado com cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo (Charrière-Ladreix 1976) para identificação de flavonóides. A análise foi realizada com um microscópio de epifluorescência (modelo BX60, Olympus Optical) equipado com filtro UV (WU: 330-385nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm), do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral da UFV. A autofluorescência foi conduzida utilizando-se o mesmo equipamento.

Para a documentação das glândulas peroladas, a superfície de folhas em diferentes fases de desenvolvimento foi observada em microscópio estereoscópio (modelo Stemi 2000 – C, Zeiss) do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV. As imagens correspondentes foram obtidas utilizando-se uma câmera fotográfica digital (modelo D-535, Olympus Optical).

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica da folha de *P. umbellata*, amostras de 0,25cm² da região mediana das folhas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). As amostras 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.

Para a avaliação da presença de tricomas e glândulas caducas, folhas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de varredura conforme a metodologia já descrita.

Resultados

Caracterização anatômica da folha

A folha de *P. umbellata*, em sua face adaxial, é composta por células de paredes retas, enquanto que em sua face abaxial essas células apresentam paredes anticlinais sinuosas (figura 1A, C). As células dessa região não apresentam nenhum tipo de espessamento, seja de parede ou cutícula. Os estômatos estão localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas e observados somente na face abaxial (figura 1C, D, 2A). As células subsidiárias variam em número, de três a cinco células por estômato, sendo que o padrão mais comum é o tetracítico (figura 1C).

Especialmente nas regiões próximas às nervuras, observam-se tricomas tectores unisseriados pluricelulares, os quais apresentam cutícula estriada (figura 1E, F). Apesar de ocorrerem em maior número em direção às nervuras, esses tricomas apresentam um padrão similar de distribuição em ambas as faces da folha de *P. umbellata*. Tricomas secretores,

caracterizados por apresentar uma célula basal inserida na epiderme, um pedicelo curto unicelular e uma célula apical saculiforme paralela à epiderme, também estão presentes em ambas as faces da folha (figura 1G, H). Glândulas peroladas foram observadas principalmente sobre a superfície abaxial da folha. Essas glândulas apresentam um tamanho considerável, sendo facilmente observadas sob vista desarmada (figura 1I).

O mesofilo é dorsiventral, constituído por uma única camada de células do parênquima paliçádico e três a quatro camadas de células do parênquima lacunoso (figura 2A, C). Há a presença de uma camada de células aclorofiladas voltada para a face abaxial da folha, em todo o limbo (figura 2A), e também voltada para a face adaxial nas regiões próximas à nervura mediana (figura 2E). Estudos ontogênicos demonstram que essa camada se origina de células do meristema fundamental (dados não publicados), e portanto pode ser classificada como hipoderme. Cristais aciculares de oxalato de cálcio são observados ao longo de todo o limbo foliar, principalmente no interior da hipoderme (figura 2A, B).

Os idioblastos ocorrem tanto na face adaxial como abaxial, entre as células epidérmicas da região intervenal e, nas preparações coradas com azul de toluidina, apresentam conteúdo corado de verde (figura 2A, C). Os idioblastos alojam-se em uma leve depressão ou em mesmo nível das células vizinhas, e são circundados por células epidérmicas alongadas, dispostas radialmente em forma de roseta (figura 1B, D). Os idioblastos são volumosos, têm formato esférico a ovalado e preenchem uma área considerável do parênquima clorofiliano (figura 2A, C, D). A distribuição dos idioblastos no limbo foliar expandido é uniforme e com densidade média de $49 \text{ idioblastos.mm}^{-2}$.

Na região das nervuras de primeira ordem, a epiderme apresenta as mesmas características descritas na região intervenal, entretanto, suas células apresentam-se menores. Nessa região, também são observados tricomas saculiformes e uma grande quantidade de tricomas tectores (figura 1E). Na região subepidérmica, observa-se colênquima do tipo angular nas duas faces da folha (figura 2E, F). O feixe vascular é caracterizado como colateral

aberto (figura 2G). Nessa região são observados elementos do protoxilema colapsados, que acumulam secreção (figura 2H). Idioblastos semelhantes àqueles observados na região intervenal também são observados entre as células epidérmicas e no parênquima das nervuras (figura 2E, F).

Independente da região do pecíolo considerada (base, meio ou ápice), os tricomas tectores e secretores assemelham-se aos descritos para o limbo foliar e as células epidérmicas do pecíolo são semelhantes às células epidérmicas da nervura mediana (figura 3B), onde poucos estômatos podem ser observados. O parênquima cortical constitui-se de células isodiamétricas, cujo tamanho aumenta na direção do parênquima medular. Na região cortical do pecíolo, observam-se calotas de colênquima angular, as quais se situam em posição oposta aos feixes vasculares colaterais (figura 3A, B). Os feixes vasculares estão dispostos em dois círculos, um interno composto de 13 feixes e um externo composto de 10 feixes vasculares aproximadamente. Elementos de protoxilema colapsados repletos de secreção são observados nos feixes vasculares (figura 3D, E). Um grande canal secretor ocorre na região medular do pecíolo (figura 3A, F). Idioblastos podem ser observados ao longo de todo o parênquima de preenchimento (figura 3C). Cristais aciculares também estão distribuídos pelo parênquima de preenchimento da nervura mediana e do pecíolo.

Caracterização histoquímica

As estruturas secretoras presentes na folha de *P. umbellata*, seja na região intervenal, na nervura de primeira ordem ou no pecíolo, apresentam reações semelhantes aos testes histoquímicos realizados. As seções transversais de folhas frescas, não submetidas a nenhum tipo de corante ou reagente, apresentam idioblastos preenchidos com secreção translúcida de aspecto oleoso, a qual, com o passar do tempo, torna-se amarela-ouro a alaranjada (figura 4A, B). Já os tricomas saculiformes apresentam uma pequena quantidade de secreção translúcida no material *in vivo* (figura 4K).

O conteúdo dos idioblastos de *P. umbellata* é rico em lipídios (tabela 1), corados de alaranjado, vermelho e negro pelo sudan III, sudan vermelho escarlata e sudan black B, respectivamente (figura 4C). Na secreção destas estruturas predominam os lipídios neutros, corados de vermelho pelo azul do Nilo, e lipídios insaturados, corados de negro pelo tetróxido de ósmio (figura 4D, E). Parte do material lipídico caracteriza-se como ácidos resínicos, indicado pela coloração avermelhada produzida pelo reagente de Nadi (figura 4F). A secreção de alguns idioblastos apresenta coloração arroxeadada quando submetidos ao reagente de Nadi, indicando mistura de resinas e óleos essenciais, embora idioblastos com predomínio de ácidos resínicos sejam mais abundantes.

Compostos fenólicos estão presentes na secreção dos idioblastos (tabela 1), adquirindo coloração negra com a aplicação do cloreto férrico (figura 4G). Ao microscópio de fluorescência, a secreção dos idioblastos apresenta autofluorescência azulada, confirmando a presença de compostos fenólicos (figura 4H). Considerando esta classe de compostos, a presença de flavonóides é identificada na secreção pelo uso dos fluorocromos cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo, com emissão de fluorescência secundária verde intenso (figura 4I). Alcalóides também são detectados na secreção (tabela 1), como indica a coloração castanho avermelhada dos idioblastos com o uso dos reagentes de Wagner e de Dittmar (figura 4J).

A secreção dos tricomas saculiformes, apesar de não ter reagido positivamente aos testes para compostos fenólicos em luz visível (tabela 1), quando observada em luz ultravioleta, apresenta autofluorescência azulada, típica da presença de fenólicos (figura 4L). Além disso, a utilização de cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo induz o aparecimento de fluorescência secundária esverdeada da secreção (figura 4M), típica da presença de flavonóides.

A presença de mucilagem foi confirmada no interior de elementos de protoxilema colapsados e no canal do pecíolo, os quais apresentam reação positiva, quando submetidos aos

testes histoquímicos do PAS e do vermelho de rutênio (tabela 1). Adicionalmente, os elementos de protoxilema adquirem coloração rosada quando submetidos ao azul de toluidina (figura 2H, 3D, E), o que confirma o resultado dos testes histoquímicos.

Infelizmente, não foi possível relatar a histoquímica das glândulas peroladas, uma vez que essas estruturas são escassas na folha de *P. umbellata*, além de não manterem sua integridade física quando cortadas em micrótomo de mesa.

Tabela 1: Caracterização histoquímica dos idioblastos, tricomas e canais secretores presentes na folha de *P. umbellata*.

Grupo de compostos	Reagente/ corante	Idioblasto	Tricoma saculiforme	Canal secretor
Lipídios	Sudan (III e vermelho escarlate)	+	-	-
	Sudan black B	+	-	-
	Sulfato de azul do Nilo	+	-	-
	Tetróxido de ósmio	+	-	-
Terpenóides	Reagente de Nadi	+	-	-
	Tricloreto de antimônio	-	-	-
	Ácido sulfúrico	-	-	-
	Reação modificada de Abraham 2,4-dinitrofenilhidrazina	-	-	-
Compostos fenólicos	Cloreto de ferro III	+	-	-
	Dicromato de potássio	+	-	-
	Cloreto de alumínio	+	+	-
	Acetato neutro de chumbo	+	+	-
	Vanilina clorídrica	-	-	-
	Floroglucina	-	-	-
Alcalóides	Reagente de Wagner	+	-	-
	Reagente de Dittmar	+	-	-
Carboidratos	Ácido periódico/ reagente de Schiff (PAS)	-	-	+
	Reagente de Lugol	-	-	-
	Vermelho de Rutênio	-	-	+
	Azul de Alciano	-	-	-
Proteínas	Xylidine ponceau (XP)	-	-	-

+, presença; -, ausência.

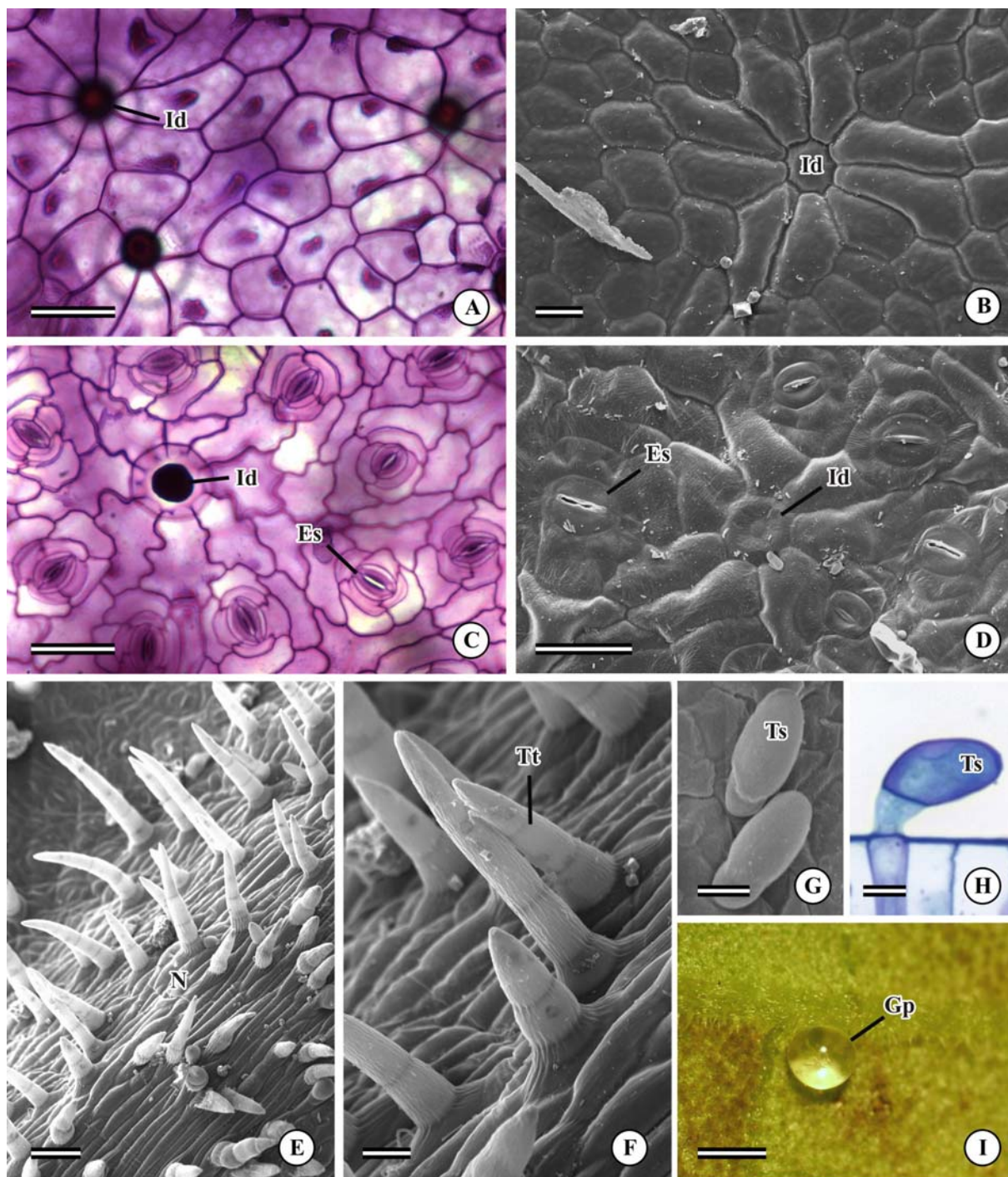


Figura 1: Fotomicrografias (A, C, H, I) e eletromicrografias de varredura (B, D-G) de seções paradérmicas (A-G, I) e transversal (H) do limbo foliar de *P. umbellata*. A, B, epiderme adaxial. C, D, epiderme abaxial. E, F, tricomas tectores sobre nervura na face abaxial. G, H, tricomas secretores na epiderme abaxial (G) e adaxial (H). I, glândula perolada sobre a epiderme abaxial. Es, estômato; Gp, glândula perolada; Id, idioblasto; N, nervura; Ts, tricoma secretor; Tt, tricoma tector. Barra: A, C, 50 μ m; B, 20 μ m; D, 30 μ m; E, 40 μ m; F, G, H, 10 μ m; I, 500 μ m.

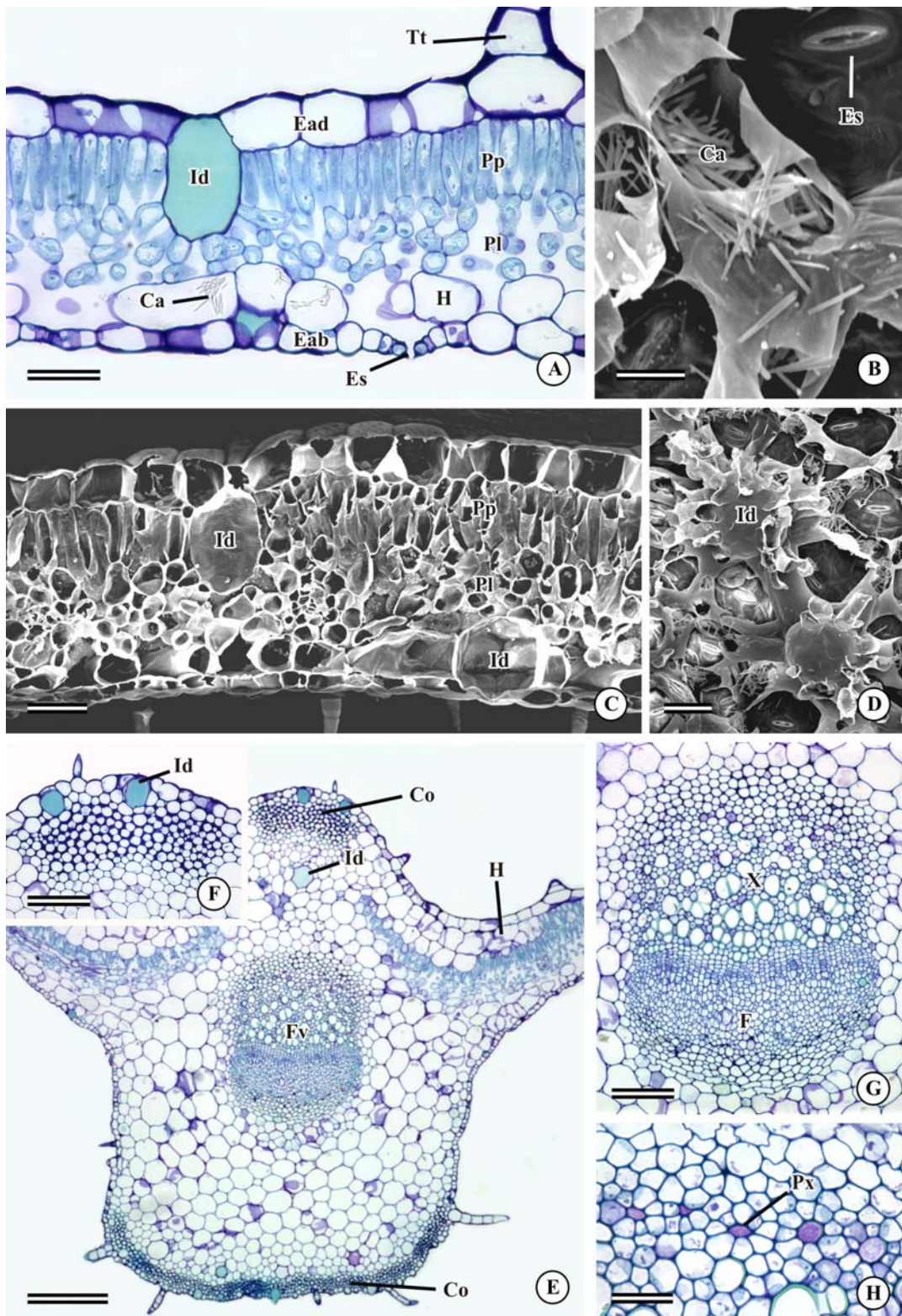


Figura 2: Fotomicrografias (A, E-H) e eletromicrografias de varredura (B-D) de seções transversais (A, C, E-H) e paradérmicas (B, D) do limbo foliar de *P. umbellata*. A, C, aspecto geral da região intervenal. B, detalhe de células da hipoderme. D, interior da região intervenal, próxima aos idioblastos voltados para a face abaxial. E, aspecto geral de uma nervura de primeira ordem. F, detalhe da figura anterior. G, feixe vascular de uma nervura de primeira ordem. H, elementos de protoxilema colapsados com secreção. Ca, cristais aciculares; Co, colênquima; Eab, epiderme abaxial; Ead, epiderme adaxial; Es, estômato; F, floema; Fv, feixe vascular; H, hipoderme; Id, idioblasto; Pl, parênquima lacunoso; Pp, parênquima paliádico; Px, elementos de protoxilema; Tt, tricoma tector; X, xilema. Barra: A, G, 50µm; B, F, 100µm; C, D, H, 30µm; E, 250µm; F, 100µm.

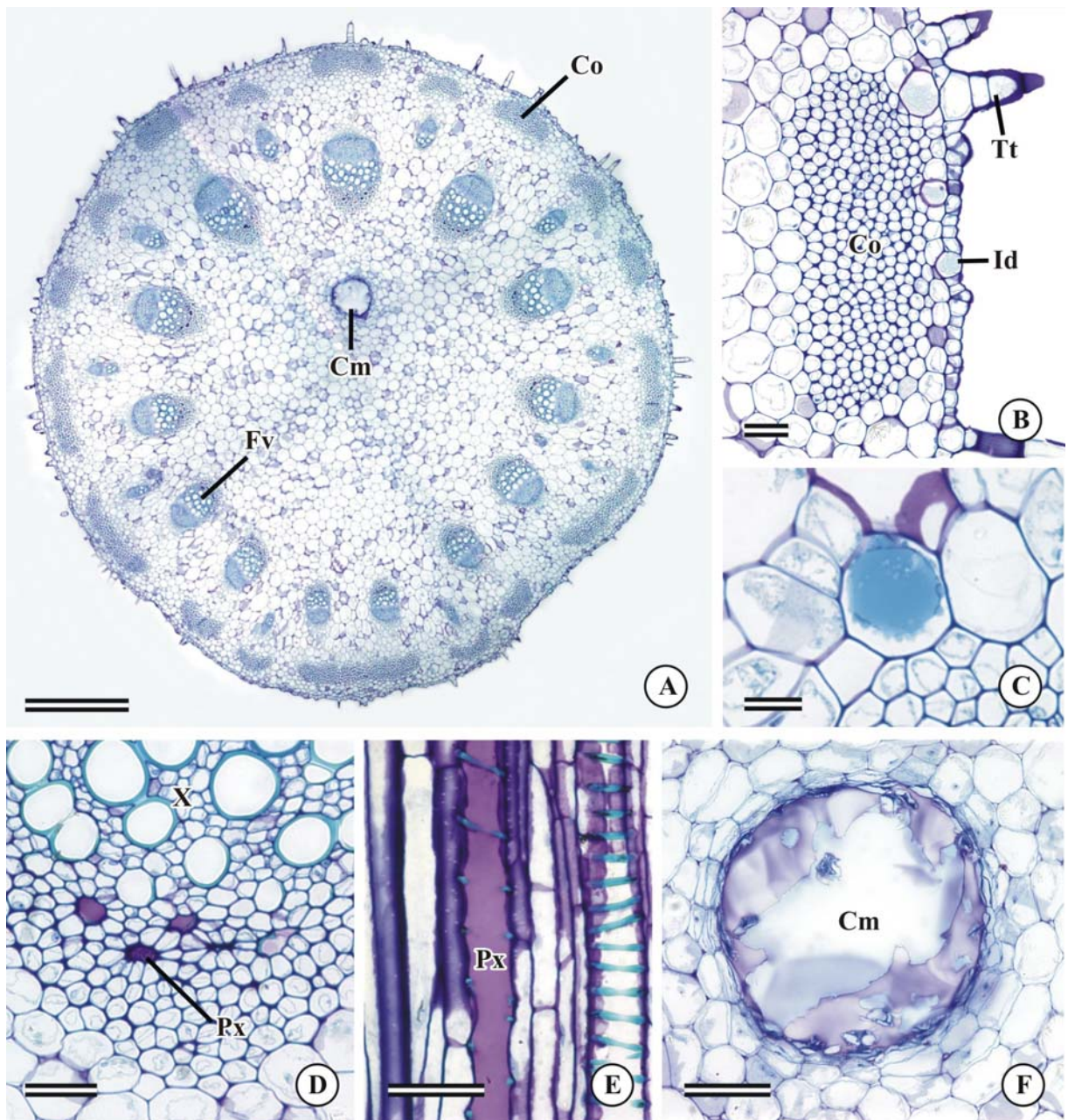


Figura 3: Fotomicrografias de seções transversais (A-D, F) e longitudinal (E) da região apical do pecíolo de *P. umbellata*. A, aspecto geral do pecíolo. B, detalhe da região cortical do pecíolo. C, detalhe do idioblasto com secreção. D, E, elementos de protoxilema colapsados com secreção. F, canal de mucilagem presente na região medular do pecíolo. Cm, canal de mucilagem; Co, colênquima; Fv, feixe vascular; Id, idioblasto; Px, elementos de protoxilema; Tt, tricoma tector; X, xilema. Barra: A, 600µm; B, D, E, 50µm; C, 20µm; F, 100µm.

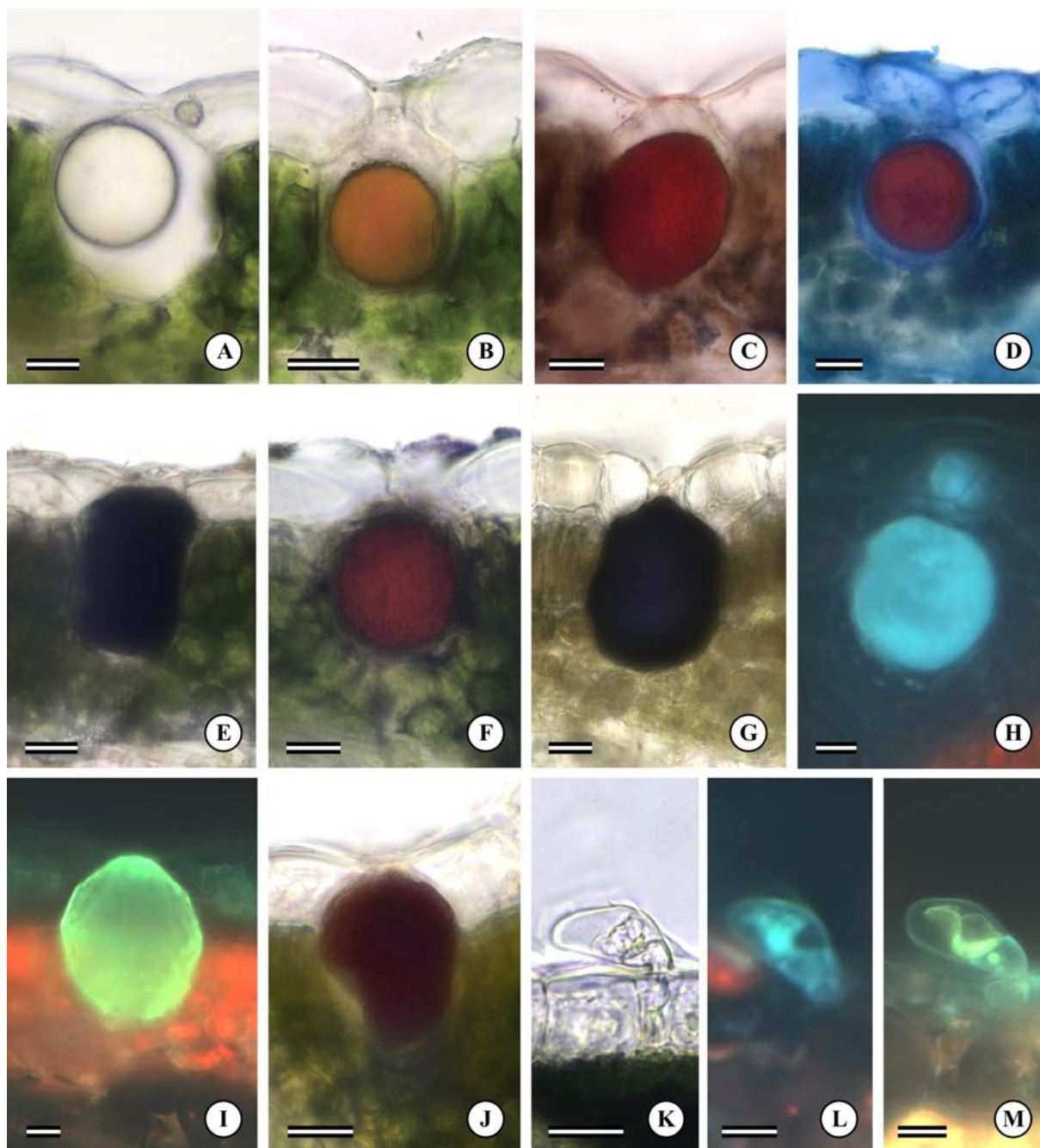


Figura 4: Testes histoquímicos realizados em seções transversais do limbo foliar de *P. umbellata*. **A**, idioblasto com secreção naturalmente translúcida. **B**, idioblasto com secreção oxidada. **C**, idioblasto com lipídios corados de vermelho pelo sudan escarlata. **D**, idioblasto com lipídios neutros corados de vermelho pelo azul do Nilo. **E**, idioblasto com lipídios insaturados corados de negro pelo tetróxido de ósmio. **F**, idioblasto com resinas coradas de vermelho pelo reagente de Nadi. **G**, idioblasto com fenólicos corados de negro pelo cloreto férrico. **H**, idioblasto com autofluorescência azulada sob luz UV. **I**, idioblasto com flavonóides exibindo fluorescência verde com cloreto de alumínio sob luz UV. **J**, idioblasto com alcalóides corados de castanho avermelhado pelo reagente de Wagner. **K**, tricoma secretor não submetido a reagentes. **L**, tricoma secretor com autofluorescência azulada sob luz UV. **M**, tricoma secretor com flavonóides exibindo fluorescência verde com acetato neutro de chumbo sob luz UV. Barra: 20 μ m.

Discussão

Caracterização anatômica da folha

Os resultados deste trabalho relatam a maior concentração de tricomas tectores sobre as nervuras de *P. umbellata*, o que corrobora o trabalho de Moraes *et al.* (1986/1987). Entretanto, ao comparar os dados de *Pothomorphe peltata* com *P. umbellata*, Moraes (1999) enfatiza a distribuição uniforme destes tricomas tectores no limbo foliar de *P. umbellata*, independente da região analisada. Tricomas tectores concentrados sobre as nervuras são comuns em várias piperáceas, como *Pothomorphe peltata* (Moraes 1999) *Piper aduncum* (Vianna & Akisue 1997), *Piper regnellii* var. *pallescens* (Pessini *et al.* 2003), *Piper diospyrifolium* (Souza *et al.* 2004) e *Piper gaudichaudianum* (Albiero *et al.* 2005b).

A localização dos estômatos na face abaxial do limbo de *P. umbellata* é uma característica que diferencia esta espécie de *P. peltata*, que é anfiestomática (Moraes 1999). Também foi relatado em várias espécies do gênero *Piper* e *Peperomia* a presença de folhas dorsiventrals e hipoestomáticas, sendo estas características comuns em espécies de Piperaceae (Johnson 1914, Murty 1960, Dasgupta & Datta 1980, Vianna & Akisue 1997, Pessini *et al.* 2003, Takemori *et al.* 2003, Souza *et al.* 2004, Albiero *et al.* 2005a, Albiero *et al.* 2005b, Albiero *et al.* 2006). Entretanto, na literatura, há registros de folhas anfiestomáticas para algumas espécies da família (Metcalf & Chalk 1950, Murty 1960, Moraes 1999). A determinação da presença e do arranjo das células subsidiárias não concorda com as descrições de Solereder (1908) e Metcalf & Chalk (1950) para a família Piperaceae, pois os autores referem-se a esses estômatos como sendo anisocíticos e, no presente trabalho foi constatado que os estômatos de *P. umbellata* são predominantemente tetracíticos.

De acordo com Moraes *et al.* (1986/1987), existem três tipos de tricomas secretores nas folhas de *P. umbellata*, caracterizados por: a) uma célula secretora globosa e pedicelo unisseriado tricelular; b) uma única célula secretora séssil; e c) tricoma fusiforme, sem

especificação de sua morfologia. De acordo com a proposta para a classificação dos tricomas de Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950), somente o tricoma do tipo saculiforme foi observado em toda a região do limbo foliar de *P. umbellata*. *P. peltata* também apresenta apenas tricomas saculiformes, os quais foram denominados por Moraes (1999) como tricomas em forma de biruta. Entretanto, esses tricomas são raros nas folhas expandidas de *P. umbellata*.

Uma possível explicação para a diferença entre os resultados é o fato de Moraes *et al.* (1986/1987) terem utilizado apenas cortes transversais em microscopia de luz para descrever os tricomas secretores. Dessa forma, diferentes seções de um mesmo tricoma poderiam ter ocasionado uma interpretação equivocada. No presente trabalho, a análise da superfície foliar ao MEV permitiu a visualização tridimensional dos tricomas secretores de *P. umbellata*, assegurando a presença de somente um padrão morfológico de tricoma secretor nas folhas.

Além dos tricomas saculiformes, enormes glândulas peroladas foram observadas na superfície da folha de *P. umbellata*, o que corrobora a observação do professor doutor Élder Antônio Sousa e Paiva, da Universidade Federal de Minas Gerais (comunicação pessoal). As glândulas peroladas são referidas por Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950) para a família Piperaceae como estruturas secretoras reluzentes, formadas de uma única e grande célula com uma base estreita inserida na epiderme. Essas glândulas são comuns no gênero *Piper* e geralmente ocorrem temporariamente, em especial, nas folhas jovens ainda enroladas pela estípula, quando presente (Moraes 1999, Silva & Machado 1999). Entretanto, em *P. umbellata* as glândulas peroladas foram visualizadas principalmente no limbo foliar expandido.

Vários trabalhos clássicos de anatomia vegetal relatam que a presença de hipoderme nas folhas das piperáceas é comum (Solereder 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Murty 1960). Entretanto, trabalhos recentes vêm confirmando que várias espécies dessa família, como as espécies do gênero *Peperomia* apresentam uma epiderme multisseriada, e não uma hipoderme

(Kaul 1977, Mauseth 1988, Gibeaut & Thomson 1989, Fahn 1990, Takemori *et al.* 2003, Evert 2006). Dessa forma, nos trabalhos mais atuais de anatomia relacionados ao gênero *Piper*, há a descrição de uma camada aclorofilada abaixo da epiderme e não de uma hipoderme, pois alguns desses estudos não apresentam uma investigação ontogênica de suas folhas (Pessini *et al.* 2003, Souza 2004, Albiero *et al.* 2005a, Albiero *et al.* 2005b, Albiero 2006).

De acordo com estudos ontogênicos (dados não publicados), a região intervenal de *P. umbellata* apresenta hipoderme em ambas as faces da folha. Enquanto a hipoderme abaxial é contínua por todo o limbo, a adaxial restringe-se às regiões próximas às nervuras de maior calibre. Esta característica também pode ser utilizada na diferenciação das espécies de *Pothomorphe* brasileiras, uma vez que *P. peltata* não apresenta epiderme múltipla e nem hipoderme (Moraes 1999).

Os idioblastos encontrados na folha de *P. umbellata* já foram relatados em todo o corpo vegetativo desta espécie e também de *P. peltata* (Moraes *et al.* 1986/1987, Moraes 1999), e a presença dessas estruturas é utilizada na distinção da família Piperaceae (Cronquist 1981, Judd *et al.* 2002). Em *P. peltata*, os idioblastos projetam-se a partir da superfície adaxial da folha e são circundados por células epidérmicas alongadas, dispostas radialmente em forma de roseta (Moraes 1999). *P. umbellata* também apresenta o mesmo padrão de células epidérmicas alongadas em forma de roseta, entretanto, os idioblastos não se projetam a partir da superfície da folha, mas estão alojados em uma depressão ou ao mesmo nível das células epidérmicas.

Como descrito em *Piper betle* (Dasgupta & Datta 1980) e *Pothomorphe peltata* (Moraes 1999), no pecíolo de *P. umbellata* há, também, a ocorrência de um grande canal na região medular. De acordo com Solereder (1908), a presença de canais de mucilagem de origem lisígena no gênero *Piper* é restrita ao eixo da planta e variam em número na região da medula. Em *P. umbellata*, o canal presente na medula do pecíolo possivelmente apresenta

origem lisígena, como sugerido por Solereder (1908). No entanto, estudos ontogênicos devem ser realizados para confirmar a origem desse canal.

Características do pecíolo de *P. umbellata*, como a presença de tricomas tectores e calotas de colênquima angular, opostas aos feixes vasculares colaterais, também foram observadas em outras espécies de Piperaceae (Dasgupta & Datta 1980, Vianna & Akisue 1997, Moraes 1999, Pessini *et al.* 2003, Albiero *et al.* 2005a, Albiero *et al.* 2005b, Albiero *et al.* 2006).

A ocorrência de cristais aciculares nos tecidos foliares de *P. umbellata* corrobora as descrições de Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950) para a família Piperaceae. Entretanto, outros tipos de cristais, como cristais prismáticos e em forma de areia também podem ocorrer em piperáceas, tais como *Piper aduncum*, *P. diospyrifolium*, *P. crassinervium* e *Peperomia dahlstedtii* (Vianna & Akisue 1997, Souza *et al.* 2004, Albiero *et al.* 2005a). A presença de cristais é uma característica importante na morfodiagnose de drogas vegetais, uma vez que a forma dos cristais, sua frequência e localização servem para identificar as diferentes espécies de plantas (Franceschi & Horner Jr. 1980, Prychid & Ruddal 1999, Franceschi & Nakata 2005), até mesmo no caso de espécies medicinais que, na maioria das vezes, já são comercializadas pulverizadas (Oliveira *et al.* 1998, Simões *et al.* 2003).

A folha de *P. umbellata* é mecanicamente muito delicada, com tecido de sustentação restrito a calotas de colênquima, sem fibras ou esclereídes que confirmam resistência mecânica. As células ordinárias da epiderme têm paredes e cutícula delgadas, que não impedem a perda excessiva de água em condições adversas. Assim, a manutenção da turgidez celular e da forma da folha depende diretamente do suprimento de água do substrato. As plantas adaptadas a ambientes sem restrições de água normalmente apresentam características semelhantes às citadas (Metcalfe & Chalk 1989, Fahn 1990). Como *P. umbellata* é típica de ambientes úmidos e sombreados (Moraes 1986), pode-se concluir que sua anatomia foliar está diretamente relacionada com seu ambiente natural.

Caracterização histoquímica

A secreção translúcida presente nos idioblastos de folhas frescas e recém-seccionadas, torna-se amarelada e até mesmo alaranjada alguns minutos após o seccionamento. Isto ocorre, provavelmente, devido à oxidação da secreção, e essa coloração deve ser considerada na avaliação dos resultados dos testes histoquímicos.

Os testes histoquímicos aplicados nas folhas de *P. umbellata* demonstram que a natureza da secreção dos idioblastos é mista e complexa, formada por compostos hidrofóbicos (lipídios neutros, lipídios insaturados e oleorresinas) e hidrofílicos (fenólicos e alcalóides). A diversidade de compostos que forma a secreção é relatada em diversas estruturas secretoras (Platt & Thomson 1992, Ascensão *et al.* 1997, Ascensão *et al.* 1999, Silva e Machado 1999, Ciccarelli 2001, Machado *et al.* 2006).

A presença de idioblastos oleíferos é frequentemente citada na literatura para as Piperaceae (Solereeder 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Cronquist 1981, Judd *et al.* 2002). Entretanto, estudos detalhados sobre a histoquímica da secreção destes idioblastos em Piperaceae inexistem na literatura. Quando presentes, esses trabalhos de histoquímica relatam as classes de compostos para as partes da planta, como limbo, pecíolo, caule e raiz, não detalhando a descrição dos compostos presentes nas diferentes estruturas secretoras observadas (Dasgupta & Datta 1980, Pessini *et al.* 2003, Braga *et al.* 2007).

Além de possuírem idioblastos oleíferos, as piperáceas também caracterizam-se por apresentar três outros tipos de estruturas secretoras: canais ou células mucilaginosas e tricomas (Johnson 1914, Murty 1960, Dasgupta & Datta 1980, Moraes *et al.* 1986/1987, Vianna & Akisue 1997, Moraes 1999, Silva e Machado 1999, Souza *et al.* 2004, Albiero *et al.* 2005, Albiero *et al.* 2006). O uso de testes histoquímicos na especificação da composição da secreção produzida pelas diferentes estruturas secretoras é importante, uma vez que podem

ocorrer variações na classe de compostos produzidos (Ascensão *et al.* 1999, Silva & Machado 1999, Ciccarelli 2001, Sant'Anna-Santos *et al.* 2006, Jacomassi *et al.* 2007).

Apesar do reagente de Nadi ter evidenciado predomínio de resinas na secreção dos idioblastos de *P. umbellata*, também foi observada a presença de óleos essenciais nessas estruturas, o que corrobora os trabalhos de Martins *et al.* (1998) e Luz *et al.* (1999), os quais analisaram a quantidade e a composição do óleo essencial desta espécie. A mistura de ácidos resínicos e óleos essenciais em uma determinada estrutura secretora é classificada por Tyler *et al.* (1988) como oleorresina. As resinas internas podem apresentar diferentes funções em diferentes plantas, no entanto essas funções, na maioria das vezes, são somente especulativas. Podem atuar na defesa contra patógenos, protegendo fisicamente as injúrias da invasão de microrganismos e insetos parasitas (McNair 1930, Dell & McComb 1978). Já os óleos essenciais são bastante reconhecidos na literatura por sua atividade antimicrobiana (Alma *et al.* 2003, Govinden-Soulangue *et al.* 2004, Baser *et al.* 2006, Lee *et al.* 2007, Cheng *et al.* 2007). Portanto, as atividades antifúngicas e antibacterianas de *P. umbellata* podem, pelo menos em parte, estar relacionadas com a presença de óleos essenciais em suas folhas.

Além de óleos essenciais, as resinas podem conter outras substâncias, como por exemplo flavonóides e substâncias graxas, em diferentes proporções (Dell & McComb 1978). Os testes histoquímicos realizados indicaram a presença de flavonóides em meio aos ácidos resínicos nos idioblastos de *P. umbellata*. Esses compostos exibem funções essenciais para as plantas, como proteção contra a radiação ultravioleta, além de apresentarem propriedades antimicrobianas e anti-herbívoras (Harbone 1993, Pourcel *et al.* 2006). Dessa forma, as propriedades fotoprotetoras, antibacterianas e antifúngicas já comprovadas nessa espécie (Adami *et al.* 1998, Amorim *et al.* 1988, Ferreira-da-Cruz *et al.* 2000, Ropke *et al.* 2003, Atindehou *et al.* 2004, Ropke *et al.* 2005, Ropke *et al.* 2006, Braga *et al.* 2007), podem também estar relacionadas com a presença de flavonóides.

Alcalóides já relatados para a espécie (Simões *et al.* 2003, Braga *et al.* 2007), também foram detectados na secreção dos idioblastos. Na literatura, muitos alcalóides são descritos como tóxicos e, geralmente, atuam na defesa contra parasitas e herbívoros, além de apresentarem efeitos alelopáticos (Robinson 1974, Levitt *et al.* 1984, Harbone 1993, Adler 2000). Esses compostos, quando em quantidades suficientes, são também tóxicos aos humanos, entretanto, em pequenas doses, muitos são farmacologicamente úteis (Tyler *et al.* 1988, Simões *et al.* 2003).

Braga *et al.* (2007), ao estudarem as atividades anti-leishmaniose e antifúngicas de algumas plantas medicinais brasileiras, concluíram que a presença de flavonóides e alcalóides nas folhas de *P. umbellata* está fortemente relacionada à sua atividade contra a *Leishmania amazonensis* e, principalmente, à sua propriedade antifúngica.

Alguns estudos fitoquímicos realizados nas folhas de *P. umbellata* também registraram a presença de sitosterol (esteróide) em seu extrato cru (Kijjoa *et al.* 1980, Mors *et al.* 2000, Braga *et al.* 2007). Mors *et al.* (2000) pressupõem que as propriedades antiofídicas dessa espécie se devem à presença de sitosterol nesta espécie. No entanto, os testes histoquímicos realizados não detectaram a presença de esteróides em qualquer parte da folha. Esse fato pode estar relacionado à pequena quantidade desse composto presente no secretado, que pode ser não detectável pelo teste utilizado.

As propriedades antiofídicas de *P. umbellata* também podem estar relacionadas à presença de flavonóides nessa planta, uma vez que essa molécula apresenta versatilidade para se ligar a polímeros biológicos (Mors *et al.* 2000, Pourcel *et al.* 2006). De fato, os flavonóides têm a capacidade de inibir fosfolipases A₂, um importante componente presente no veneno de cobras (Mors *et al.* 2000).

Assim como os idioblastos, os tricomas saculiformes de *P. umbellata* apresentaram reação positiva para flavonóides em luz ultravioleta (UV). Embora os testes para a detecção de fenóis em luz visível tenham resultados negativos nesses tricomas, não se pode concluir

que esses compostos não façam parte do secretado. Devido à instabilidade dos flavonóides (Pourcel 2006), essa molécula é, na maioria das vezes, não detectável, exceto em microscopia de fluorescência. Um exemplo deste mesmo tipo de situação pode ser verificado no trabalho de Sant'Anna-Santos *et al.* (2006), os quais realizaram a análise histoquímica dos ductos secretores do caule de *Spondias dulcis*. A secreção dos idioblastos apresentou reação positiva ao teste para fenóis, quando analisados sob luz visível e luz UV, o que pode estar relacionado à grande quantidade desse composto nessas estruturas.

Algumas plantas apresentam estruturas e tecidos internos que secretam mucilagem, tais como canais, cavidades, idioblastos e parênquimas. Existem muitas funções atribuídas para a mucilagem presente no interior das plantas, no entanto, a maioria é especulativa. Foi relatado que algumas plantas suculentas apresentam parênquima secretor de mucilagem como uma estratégia de resistência à seca (Fahn 1979, Castro & Machado 2003). Experimentos realizados com coníferas comprovaram a atividade da mucilagem na manutenção do potencial hídrico dessas espécies ao longo das estações (Distelbarth & Kull 1985). Portanto, o canal de mucilagem presente em *P. umbellata* pode estar relacionado ao acúmulo de água, a qual parece ser fundamental para a manutenção da estrutura foliar nessa espécie. Essa teoria é suportada pelo fato dessa planta apresentar uma folha consideravelmente grande, mesmo com a falta de tecidos mecânicos na mesma.

Conclusões

A anatomia foliar de *P. umbellata* indica que a folha é mecanicamente muito frágil, e a defesa da planta é prioritariamente química, haja vista a grande quantidade de estruturas secretoras e metabólitos secretados, como oleorresinas, fenólicos e alcalóides. A grande variedade de metabólitos identificados nas estruturas secretoras pode estar relacionada às diversas atividades terapêuticas atribuídas à espécie.

Referências Bibliográficas

- Adami YL, Milhous W, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. 1998.** *In vitro* antimalarial activity of crude extracts of *Pothomorphe peltata* and *P. umbellata* (Piperaceae). *Tropical Medicine* **40**(2):91-94.
- Adler LS. 2000.** Alkaloid uptake increases fitness in a hemiparasitic plant via reduced herbivory and increased pollination. *The American Naturalist* **156**(1):92-99.
- Albiero ALM, Paoli AAS, Souza LA, Mourão KSM. 2005a.** Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* **19**(2):305-312.
- Albiero ALM, Souza LA, Mourão KSM, Almeida OJG, Lopes WAL. 2005b.** Morfoanatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense* **24**(4):550-554.
- Albiero ALM, Paoli AAS, Souza LA, Mourão KSM. 2006.** Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **16**(3):379-391.
- Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. 2003.** Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26**(12):1725-1729.
- Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RSB. 1988.** Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. *Journal of Ethnopharmacology* **24**:101-106.
- Ascensão L, Marques N, Pais MS. 1997.** Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Sciences* **158**:249-258.
- Ascensão L, Mota L, Castro MM. 1999.** Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* **84**:437-447.
- Atindehou KK, Schmid C, Brun R, Kone MW, Traore D. 2004.** Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology* **90**:221-227.

- Baser KHC, Demirci B, Iscan G, Hashimoto T, Demirci F, Noma Y, Asakawa Y. 2006.** The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* Boiss. var. *discoidea* Boiss. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **54**(2):222-225.
- Boza HS. 1998.** Revisión del género *Pothomorphe* Miq. (Piperaceae) en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* **19**:41-44.
- Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. 2007.** Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **111**:396-402.
- Brundrett MC, Kendrick B, 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.
- Caniato R, Filippini R, Cappelletti EM, Appendino G. 1989.** Detection of peroxides in intact plant material. *Fitoterapia* **60**:549-551.
- Castro MM, Machado SR. 2003.** Células e tecidos secretores. In *Anatomia Vegetal* (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, eds.). Viçosa: Editora UFV.
- Charrière-Ladriex Y. 1976.** Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* **129**:167-174.
- Cheng A, Lou Y, Mao Y, Lu S, Wang L, Chen X. 2007.** Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(2):179-186.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 2001.** Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**:637-644.
- Cronquist A. 1981.** *An integrated system of classification of flowering plants*. 2.ed. New York: Columbia Univ. Press.
- Dasgupta A, Datta PC. 1980.** Medicinal species of *Piper*, pharmacognostic delimitations. *Quarterly Journal of Crude Drug Research* **18**(1):17-25.
- David R, 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* **D258**:1338-1340.
- Dell B, McComb AJ. 1978.** Plant resins – their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research* **6**:277-316.

- Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS. 2002.** Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**:69-91.
- Distelbarth H, Kull U. 1985.** Physiological investigations of leaf mucilages II. The mucilage of *Taxus baccata* L. and *Thuja occidentalis* L. *Israel Journal of Botany* **34**:113-128.
- 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: Jonh Wiley & Sons, Inc.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A. 1990.** *Plant Anatomy*. 4.ed. Jerusalem: Butterworth Heinemann.
- Fahn A, Shimony C. 1996.** Glandular trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials. *Annals of Botany* **77**:25-34.
- Ferreira JFS, Janick J. 1995.** Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences* **156**(6):807-15.
- Ferreira-da-Cruz MF, Adami YL, Espinola-Mendes EC, Figueiredo MR, Daniel-Ribeiro CT. 2000.** The intraperitoneal *Plasmodium berguei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Experimental Parasitology* **94** :243-247.
- Fouqué A. 1980.** Les plantes médicinales présentes en Forêt Guyanaise. *Fruits* **35**(12):759-768.
- Franceschi VR, Horner Junior HT. 1980.** Calcium oxalate in plants. *The Botanical Review* **46**:361-427.
- Franceschi VR, Nakata PA. 2005.** Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* **56**:41-71.
- Freise FW. 1933.** Plantas medicinais brasileiras. *Boletim de Agricultura. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo* **34** (único):428.
- Furr M, 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.
- Ganter P, Jollés G. 1969/1970.** *Histologie normale et pathologique*. v. I e II. Paris: Gauthier – Villars.
- Geissman TA, Griffin TS. 1971.** Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry* **10**:2475-2485.
- Gibeaut DM, Thomson WW. 1989.** Leaf ultrastructure of *Peperomia obtusifolia*, *P. camptotricha* and *P. scandens*. *Botanical Gazette* **150**(2):108-114.

- Govinden-Soulange J, Magan N, Gurib-Fakim A, Gauvin A, Smadja J, Kodja H. 2004.** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils from endemic *Psiadia* species growing in Mauritius. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **27**(11):1814-1818.
- Harbone JB. 1993.** *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4.ed. London/ San Diego/ New York/ Boston/ Sydney/ Tokyo/ Toronto: Academic Press Limited.
- Hardman R, Sofowora EA. 1972.** Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin in plant tissues. *Stain Technology* **47**(4):205-208.
- Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. 2007.** Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). *Acta Botanica Brasilica* **21**(3): 575-597.
- Jensen W A. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Johnson DS. 1914.** Studies of the development of the Piperaceae. II. The structure and seed-development of *Peperomia hispidula*. *American Journal of Botany* **1**(7):323-339.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 2002.** *Plants systematics: a phylogenetic approach*. 2 ed. Massachussets: Sinauer Associates, Inc.
- Kaul RB. 1977.** The role of the multiple epidermis in foliar succulence of *Peperomia* (Piperaceae). *Botanical Gazette* **138**(2):213-218.
- Kijjoo A, Giesbrecht AM, Akisue MK, Gottlieb OR, Gottlieb HE. 1980.** 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Medica* **39**:85-87.
- Kolbi D, Müller M. 2004.** Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Curcubita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany* **94**:515-526.
- Lee SB, Cha KH, Kim SN, Altantsetseg S, Shatar S, Sarangerel O, Nho CW. 2007.** The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms. *The Journal of Microbiology* **45**(1):53-57.
- Levitt J, Lovett JV, Garlick PR. 1984.** *Datura stramonium* allelochemicals: longevity in soil and ultrastructural effects on root tip cells of *Helianthus annuus* L. *New Phytologist* **97**(2):213-218.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002.** *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Luz AIR, Silva JD, Zoghbi MGB, Andrade EHA, Silva MHL, Maia JGS. 1999.** Volatile constituents of Brazilian Piperaceae, part 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. *Journal of Essential Oil Research* **11**:479-481.

- Mace ME, Bell AA, Stipanovic RD. 1974.** Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**:1297-1302.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**:2423-2426.
- Machado SR, Gregório EA, Guimarães E. 2006.** Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* **97**:357-369.
- Maia V. 1979.** *Técnica histológica*. São Paulo: Atheneu.
- Martins AP, Salgueiro L, Vila R, Tomi F, Cañigueral S, Casanova J, Cunha AP, Adzet T. 1998.** Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry* **49**(7):2019-2023.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*. Menlo Park/California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- McNair JB. 1930.** Gum, tannin and resin in relation to specificity and function. *American Journal of Botany* **17**(3):187-196.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Metcalf CR, Chalk L. 1989.** *Anatomy of the Dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Moraes MS, Oliveira F, Akisue MK, Akisue G, Mancini B. 1985.** Morfodiagnose da droga pariparoba. *Revista de Ciências Farmacêuticas de São Paulo* **7**:27-37.
- Moraes MS. 1986.** Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **1**(1):101-108.
- Moraes MS, Oliveira F, Mancini B, Akisue MK, Akisue G. 1986/1987.** Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba – *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Revista de Ciências Farmacêuticas de São Paulo* **8/9**:77-90.
- Moraes MS. 1999.** *Caracterização morfo-anatômica e fitoquímica da “caápeba do Norte” Pothomorphe peltata (L.) Miq. – Piperaceae*. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.
- Mors WB, Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira NA. 2000.** Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* **55**:627-642.
- Murty YS. 1960.** Studies in the order Piperales – I. A contribution to the study of vegetative anatomy of some species of *Peperomia*. *Phytomorphology* **10**:50-59.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**:368-373.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. 1998.** *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu.

- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry theoretical and applied*. v.2. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingston.
- Perazzo FF, Souza GHB, Lopes W, Cardoso LGV, Carvalho JCT, Nanayakkara NPD, Bastos JK. 2005.** Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology* **99**:215-220.
- Pereira NA, Jaccoud RJS, Mors WB. 1996.** Triaga Brasilica: renewed interest in a seventeenth-century panacea. *Toxicon* **14**(5):511-516.
- Pessini GL, Albiero ALM, Mourão KSM, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DAG. 2003.** Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. *Acta Farmacêutica Bonaerense* **22**(3):209-216.
- Platt KA, Thomson WW. 1992.** Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry and biochemistry. *International Journal of Plant Sciences* **153**(3):301-310.
- Pourcel L, Routaboul J, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. 2006.** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**(1):29-36.
- Prychid CJ, Rudall PJ. 1999.** Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* **84**:725-739.
- Robinson T. 1974.** Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science* **184**(4135):430-435.
- Ropke CD, Meirelles RR, Silva VV, Sawada TCH, Barros SBM. 2003.** *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-irradiation. *Photochemistry and Photobiology* **78**(5):436-439.
- Ropke CD, Sawada TCH, Silva VV, Michalany NS, Barros SBM. 2005.** Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage. *Clinical and Experimental Dermatology* **30**:272-276.
- Ropke CD, Silva VV, Kera CZ, Miranda DV, Almeida RL, Sawada TCH, Barros SBM. 2006.** *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. *Photochemistry and Photobiology* **82**:439-442.
- Sant'Anna-Santos BF, Thadeo M, Meira RMSA, Ascensão L. 2006.** Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore* **30**(3):481-489.

- Silva EMJ, Machado SR. 1999.** Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **22**(2):117-124.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2003.** *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFRGS.
- Solereder H. 1908.** *Systematic Anatomy of the Dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Souza LA, Moscheta IS, Oliveira JHG. 2004.** Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii* C. DC., *Ottonia martiana* Miq. and *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae). *Gayana Botanica* **61**(1):6-17.
- Svoboda K, Hampson J, Hunter T. 1998/1999.** Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. *The International Journal of Aromatherapy* **9**(3):124-131.
- Takemori NK, Bona C, Alquini Y. 2003.** Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) – I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. *Acta Botanica Brasilica* **17**(3):387-394.
- Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. 1988.** *Pharmacognosy*. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Vianna WO, Akisue G. 1997.** Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. *Lecta* **15**(1/2):11-62.
- Vidal BC. 1977.** Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* **22**:45-64.
- Yuncker TG. 1973.** The Piperaceae of Brazil II: *Piper* – Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* **3**:29-284.

CAPÍTULO 2

Ontogenia dos idioblastos secretores presentes no limbo foliar de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae)

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo caracterizar a ontogenia dos idioblastos presentes no limbo foliar de *P. umbellata*, uma planta utilizada popular e cientificamente pelas suas propriedades medicinais. Para a análise da ontogenia dos idioblastos, primórdios foliares e porções da região mediana do limbo foliar em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05M. As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato. O material, cortado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com 5µm de espessura, foi corado com azul de toluidina e montado sob lamínula com resina sintética. Para a identificação de lipídios e mucilagens nos idioblastos em diferentes fases de desenvolvimento, parte do material cortado foi submetido ao sudan escarlata e vermelho de Rutênio. Para a caracterização dos idioblastos, folhas completamente expandidas foram diafanizadas e amostras de folhas em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixadas em FAA₅₀ e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Os idioblastos presentes na região das nervuras de maior calibre desenvolvem-se a partir do meristema fundamental e da protoderme, mais precocemente que na região intervenal, onde o desenvolvimento dos idioblastos ocorre apenas a partir de iniciais da protoderme. Em ambas as regiões as iniciais dos idioblastos são distinguíveis pelo aumento de tamanho, pela presença de pequenos vacúolos e núcleo e nucléolo conspícuos. A secreção do idioblasto é observada na folha desde sua origem até sua senescência, o que sugere para essa estrutura um papel de defesa química ao longo de toda a vida foliar.

ABSTRACT – Ontogeny of the secretory idioblasts present in the leaf limb of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae). This work had as goals the characterization of the ontogeny of the idioblasts present in the leaf limb of *P. umbellata* – a plant popularly and scientifically used due to its medicinal properties. With regard to the analysis of ontogeny of the idioblasts, leaf primordia and portions of the leaf limb under different developmental stages were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M phosphate buffer. The samples were dehydrated in ethylic series and included in methacrylate. The material after transversally and longitudinally sliced in rotary microtome (5 µm wide) was stained with Toluidine Blue and mounted under coverslip with synthetic resin. Concerning the identification of lipids and mucilages in idioblasts under different developmental stages, part of the sliced material was submitted to Sudan Scarlet and Ruthenium Red. For the characterization of idioblasts, completely expanded leaves were diaphanized and samples of the leaves under different developmental stages were fixed in FAA₅₀ and processed for the scanning electron microscopy. The idioblasts present in the region of the veins of greater caliber were developed from the fundamental meristem and from the protoderm, more precociously from the interveinal region, where the development of the idioblast occurs only from initials of the protoderm. In both regions, the idioblasts initials are noticeable due to the increase of size, presence of little vacuoles and nucleus and nucleolus conspicuous. The secretion of the idioblast is observed in the leaf since its origin until its senescence, what suggests that this structure has a chemical defence role along the leaf's life.

Introdução

A família Piperaceae é caracterizada por apresentar idioblastos secretores de óleos essenciais e alcalóides (Solereeder 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Cronquist 1981, Judd *et al.* 2002). Os idioblastos são células que se distinguem das demais células do tecido, seja pela forma, tamanho ou conteúdo. Podem conter grande variedade de substâncias, tais como óleos, resinas, mucilagens, gomas, taninos e cristais (Mauseth 1988, Fahn 1990, Evert 2006).

Os idioblastos oleíferos diferem das células adjacentes pelo seu tamanho avantajado e pela presença de gotas de óleo (Bakker & Gerritsen 1990, Evert 2006). O local inicial de deposição do óleo é definido através da formação de protuberâncias na parede celular do idioblasto. Essas protuberâncias muitas vezes apresentam a forma de uma cúpula e ocorrem em pontos fixos da parede da célula. A parede de um idioblasto maduro, secretor de óleo, normalmente consiste de três camadas: a) uma camada celulósica externa (parede primária); b) uma camada intermediária suberizada; e c) uma camada celulósica interna (parede terciária), que geralmente dá origem à cúpula (Maron & Fahn 1979, Platt-Aloia *et al.* 1983, Mariani *et al.* 1989, Bakker & Gerritsen 1990, Bakker *et al.* 1991, Platt & Thomson 1992).

Outras estruturas secretoras comuns nas piperáceas, principalmente nos gêneros *Piper* e *Pothomorphe*, são os tricomas secretores e os canais de mucilagem (Dasgupta & Datta 1980, Mohandas & Shah 1982, Vianna & Akisue 1997, Moraes 1999, Silva & Machado 1999, Pessini *et al.* 2003, Souza *et al.* 2004, Albiero *et al.* 2005a, Albiero *et al.* 2005b, Albiero *et al.* 2006). De acordo com Solereeder (1908), os canais de mucilagem presentes na família originam-se a partir de processos lisígenos.

Pothomorphe umbellata é um subarbusto ereto, perene e nativo de quase todo o Brasil, típico de locais úmidos, sombreados e ricos de húmus, e que ocorre desde a Amazônia até a região Sul do Brasil (Moraes *et al.* 1985, Moraes 1986, Lorenzi & Matos 2002). Nessa espécie, os tricomas secretores ocorrem nas folhas e são caracterizados por apresentar uma

célula basal inserida na epiderme, um pedicelo curto unicelular e uma célula apical saculiforme paralela à epiderme (Solleder 1908, Metcalfe & Chalk 1950). Idioblastos secretores de oleorresina também já foram relatados para todo o corpo vegetativo dessa espécie, enquanto que os canais de mucilagem estão presentes apenas no caule e no pecíolo (Moraes *et al.* 1985, Moraes *et al.* 1986/ 1987).

A presença de estruturas secretoras em *P. umbellata* pode estar relacionada ao seu uso popular e científico como fitoterápico (Fouqué 1980, Moraes 1986, Pereira *et al.* 1996, Mors *et al.* 2000, Lorenzi & Matos 2002, Di Stasi *et al.* 2002), uma vez que os princípios ativos encontrados em plantas medicinais geralmente ocorrem em estruturas secretoras especializadas (Fahn 1979, Svoboda *et al.* 1998/ 1999). No entanto, apesar de já ter sido relatada nesta espécie a presença de tricomas, idioblastos e canais secretores, nenhum estudo relacionado à sua ontogenia foi realizado.

A análise da ontogenia de estruturas secretoras pode fornecer dados para esclarecer seu processo de desenvolvimento e síntese da secreção (Ascensão & Pais 1987, Mariani *et al.* 1989, Silva & Machado 1999, Monteiro *et al.* 2001, Ciccarelli *et al.* 2001, Kalachanis & Psaras 2005, Moura *et al.* 2005, Liang *et al.* 2006). Como os idioblastos são as estruturas secretoras mais abundantes em *P. umbellata*, o objetivo desse trabalho foi realizar o estudo anatômico dos idioblastos do limbo foliar, com a finalidade de esclarecer sua origem e desenvolvimento.

Material e Métodos

Mudas de 30 a 60 centímetros de altura de *P. umbellata* foram coletadas de uma área de cultivo de plantas medicinais localizada no Sítio Violeira em Viçosa, Minas Gerais e transplantadas para vasos plásticos contendo terra e areia numa proporção de 3:1. As mudas foram cultivadas sob sombrite com 35% de cobertura, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa com a inscrição VIC 30.218.

Microscopia de luz (ML)

A análise da ontogenia dos idioblastos secretores foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. As amostras, primórdios foliares e porções da região mediana do limbo foliar em diferentes fases de desenvolvimento, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,05M, por 24 horas, à temperatura ambiente, e lavadas no mesmo tampão por três vezes, 10 minutos cada. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com 5µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permout).

Para a localização de lipídios, pectinas e mucilagens nos idioblastos em diferentes fases de desenvolvimento, parte do material cortado em micrótomo rotativo foi submetido ao Sudan escarlate (Brundrett *et al.* 1991) e ao vermelho de Rutênio (Johansen 1940) e montado sob lamínula com gelatina glicerinada.

Para a caracterização dos idioblastos completamente desenvolvidos, amostras de folhas expandidas foram diafanizadas, coradas com violeta cristal 1%, desidratadas em série alcoólica/ xilólica crescente e montadas em resina sintética. Para a caracterização da secreção, quanto ao aspecto e coloração, folhas frescas foram cortadas em micrótomo de mesa e montadas diretamente em glicerina 50%.

A observação e a obtenção das imagens das seções transversais, longitudinais e das folhas diafanizadas de *P. umbellata* em diferentes fases de desenvolvimento foram feitas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), com sistema U-PHOTO, acoplado a uma câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., New York, USA) e a um microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de primórdios foliares e da região mediana de folhas de *P. umbellata*, de aproximadamente 0,25cm², em diferentes estádios de desenvolvimento, foram fixadas em FAA₅₀, por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). As amostras foram desidratadas em série etanólica crescente e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂, utilizando-se equipamento apropriado (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após a montagem das amostras em suportes metálicos com fita dupla-face, realizou-se a deposição metálica com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, Viçosa, Minas Gerais.

Resultados

As folhas de *P. umbellata* originam-se dos meristemas apicais da parte aérea localizados nos ápices dos caules e nas axilas das folhas adultas. Os meristemas, assim como os primórdios foliares, são envolvidos por uma estípula, a qual já apresenta tecidos relativamente bem diferenciados, inclusive idioblastos (figura 1A). Com a expansão foliar, a estípula é rompida e cai. Os primórdios foliares são enrolados longitudinalmente (prefoliação convoluta) e a região das nervuras de maior calibre apresenta-se em estágio mais avançado de diferenciação que as regiões intervenais (figura 1B), inclusive em relação à diferenciação dos idioblastos. Independentemente da região considerada, o processo de diferenciação dos tricomas secretores e tectores a partir da protoderme é bastante precoce quando comparado ao processo de desenvolvimento dos demais tipos celulares.

Na região das nervuras de maior calibre, as iniciais dos idioblastos localizam-se tanto no meristema fundamental como na protoderme, e são inicialmente distinguíveis pelo aumento de tamanho, pela presença de pequenos vacúolos e núcleo e nucléolo conspícuos (figura 2A). Pelo teste com Sudan é possível constatar que a síntese de lipídios já ocorre no citoplasma dos idioblastos em início de desenvolvimento (figura 2I). Posteriormente, a célula inicial se expande mais, e a coalescência dos numerosos vacúolos contribui para a formação de um grande vacúolo e isto promove a compressão do citoplasma e do núcleo contra a parede celular (figura 2B, C). Em uma fase posterior, o núcleo é desintegrado e ocorre deposição de material com coloração rosada no interior do vacúolo (figura 2D). Até esta fase as células adjacentes ao idioblasto ainda mantêm características meristemáticas, como citoplasma denso e núcleo e nucléolo conspícuos. Quando o idioblasto alcança a máxima expansão do seu volume, o citoplasma se torna desorganizado e com aspecto alveolar (figura 2E). Nesta fase, as células adjacentes ao idioblasto já estão diferenciadas. A deposição de material aumenta no interior do vacúolo e é possível detectar um ou mais locais de contato desse material à parede

celular (figura 2E). Ao contrário do material depositado no vacúolo, os lipídios inicialmente se mantêm no citoplasma, rodeando o grande vacúolo (figura 2J). Posteriormente, ocorre fracionamento do material depositado no vacúolo (conteúdo rosa), início da deposição de fenólicos (conteúdo esverdeado) (figura 2F) e a expansão do material lipídico no idioblasto (figura 2K). Quando o idioblasto encontra-se completamente desenvolvido, não mais se observa o material rosa no interior da célula (figura 2G). Por outro lado, o interior dos idioblastos já se mostra repleto de lipídios (figura 2L). Nas folhas senescentes (folhas amareladas), a secreção contida nos idioblastos retrai-se, sendo possível observar o provável local de ligação da cavidade de secreção à parede celular do idioblasto (figura 2H).

Antes da distinção das células iniciais dos idioblastos, a região intervenal é composta por uma única camada de células protodérmicas, quatro camadas de células do meristema fundamental e pequenos cordões procambiais (figura 1C). Em seção transversal, as células da protoderme e do meristema fundamental são quadrangulares e apresentam núcleos grandes.

Na região intervenal, os idioblastos voltados para a face abaxial da folha diferenciam-se precocemente (figura 1D). Nessa região, as iniciais dos idioblastos originam-se a partir da protoderme, e distinguem-se das demais células do tecido pelo seu tamanho avantajado, citoplasma vacuolado e presença de núcleo e nucléolo mais conspícuos (figura 3A). Nesse estágio, as células protodérmicas estão alongadas verticalmente, três camadas de células do meristema fundamental ainda são pouco diferenciadas, e uma quarta camada de células maiores e mais vacuoladas voltadas para a face abaxial, caracteriza o início da diferenciação da hipoderme (figura 1D). A expansão das iniciais ocorre, a princípio, pelo aumento do número e tamanho dos vacúolos (figura 3B, C). O crescimento dos idioblastos é intrusivo, pois as células iniciais crescem em direção ao parênquima clorofiliano (figura 3A-C). Posteriormente, os vacúolos coalescem formando um grande vacúolo central, que promove a compressão do citoplasma contra a parede celular. (figura 3E). Nessa fase, já é possível perceber a deposição de material com coloração rosada no interior do vacúolo, o qual parece

estar conectado com a parede periclinal externa do idioblasto (figura 3E). Ao longo do desenvolvimento dos idioblastos, há o espessamento da parede periclinal externa dessas células (figura 3C, E), a qual se apresenta rica em pectinas, como demonstra sua coloração rosada com o vermelho de Rutênio (figura 3D). Quando a célula inicia a secreção de fenólicos (conteúdo esverdeado), não é mais detectado o material rosa no interior do vacúolo (figura 3F), nem o espessamento de pectina. Os idioblastos já se apresentam repletos de secreção mesmo quando os demais tecidos foliares ainda encontram-se pouco diferenciados, principalmente o parênquima clorofiliano (figura 1E). Porém, nesse estágio, essas células encontram-se ainda em expansão (figura 3G). No idioblasto completamente diferenciado, o citoplasma desaparece e a secreção ocupa todo o volume celular (figura 3H). Neste estágio os tecidos foliares já estão completamente diferenciados, ainda que a folha esteja em processo de expansão (figura 1F). Os idioblastos de folhas já senescentes (folhas amareladas), apresentam retração do material secretado e, ocasionalmente, o rompimento da parede periclinal externa. Similar aos idioblastos da região das nervuras, o teste com Sudan revelou que nos idioblastos da região intervenal os lipídios inicialmente localizam-se no citoplasma, rodeando o(s) vacúolo(s) (figura 3I, J). Posteriormente, ocorre a expansão do material lipídico (figura 3K), ocupando todo o volume celular (figura 3L).

Na região das nervuras de maior calibre, os idioblastos concentram-se no parênquima fundamental e entre as células epidérmicas; na região intervenal, estes ocorrem apenas entre as células epidérmicas e podem alcançar grandes proporções do parênquima paliçádico ou lacunoso (figura 1F, 4B-D). Na superfície foliar, essas células encontram-se circundadas por células epidérmicas alongadas em forma de roseta e podem estar alojadas em uma depressão ou ao mesmo nível das células vizinhas (figura 4A, B). No material *in vivo*, a secreção do idioblasto é translúcida e de aspecto oleoso (figura 4E). Tricomas tectores e secretores são observados na folha completamente expandida, mas em quantidades menores do que nas folhas em expansão (figura 4F).

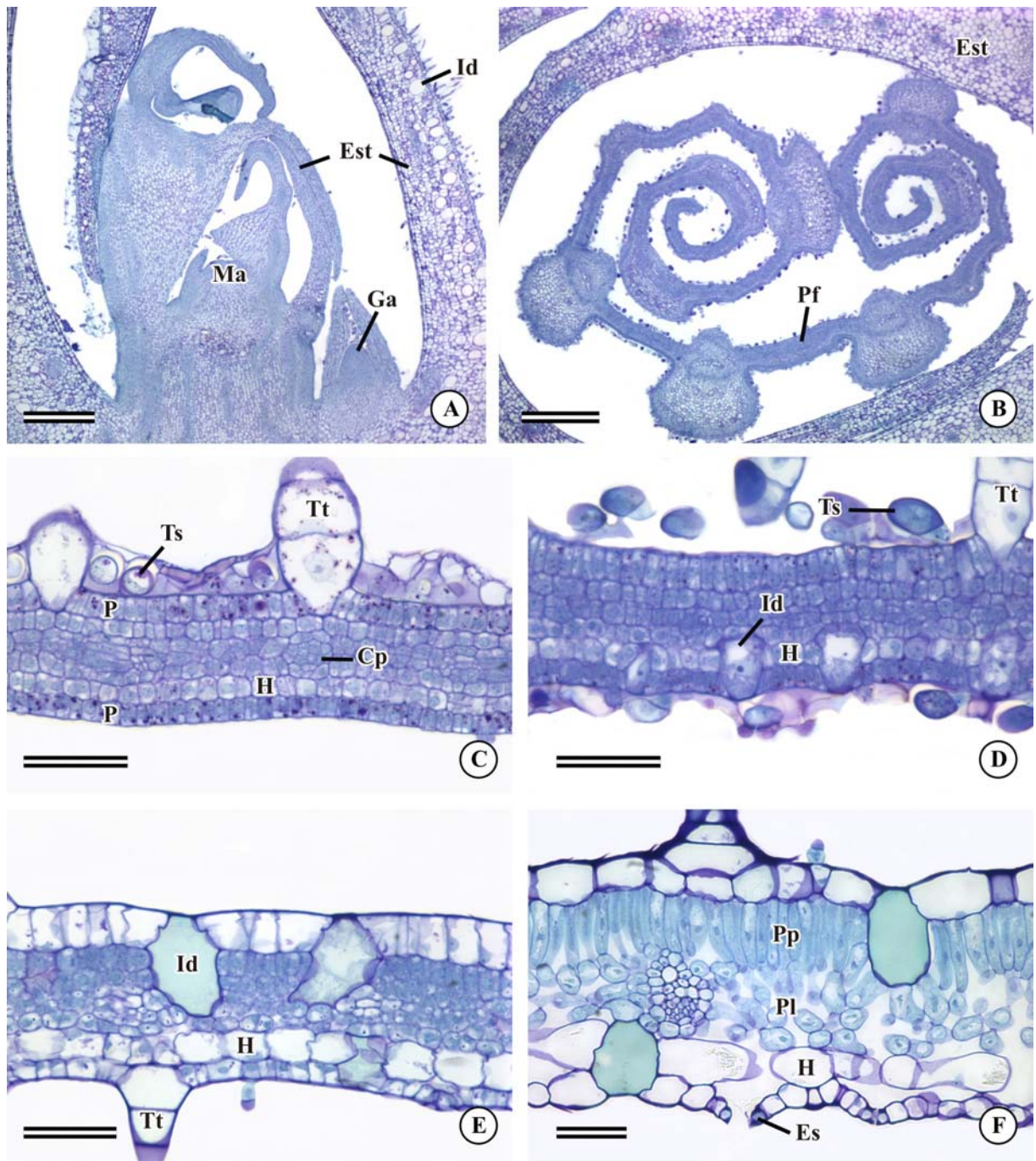


Figura 1: Fotomicrografias de seções longitudinais (A) e transversais (B-F) de primórdios foliares e folhas em diferentes fases de desenvolvimento de *P. umbellata*. **A**, meristema apical de parte aérea envolto pela estípula. **B**, primórdio foliar evidenciando a diferenciação precoce das nervuras de maior calibre. **C**, primórdio foliar com desenvolvimento de tricomas tectores e secretores. **D**, primórdio foliar com o desenvolvimento inicial dos idioblastos voltados para a face abaxial. **E**, folha em expansão com idioblastos quase completamente desenvolvidos em meio ao parênquima clorofiliano ainda em processo de diferenciação. **F**, folha completamente expandida com idioblastos voltados para a face adaxial e abaxial. Cp, cordões procambiais; Es, estômato; Est, estípula; Ga, gema axilar; H, hipoderme; Ma, meristema apical do caule; Id, idioblasto; P, protoderme; Pf, primórdio foliar; Pl, parênquima lacunoso; Pp, parênquima paliádico; Ts, tricoma secretor; Tt, tricoma tector. Barra: A, 300 μ m; B, 400 μ m; C-F, 50 μ m.

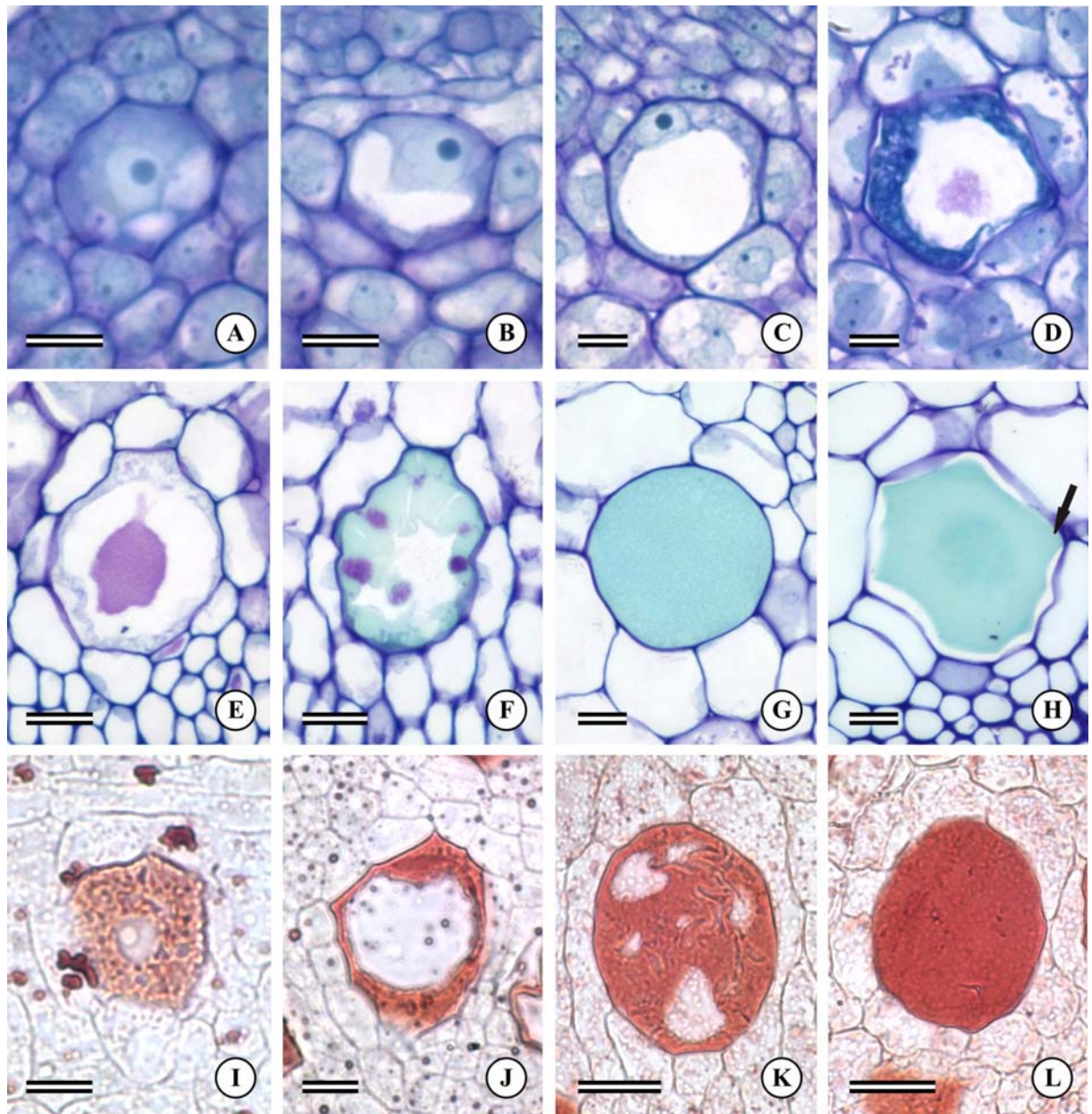


Figura 2: Fotomicrografias de seções transversais dos idioblastos das nervuras de primeira ordem de folhas de *P. umbellata* em diferentes fases de desenvolvimento. **A-H**, coloração com azul de toluidina; **I-L**, coloração com Sudan escarlate. **A**, idioblasto em sua fase inicial de desenvolvimento, com núcleo e nucléolo conspícuos e pequenos vacúolos. **B, C**, idioblasto evidenciando o crescimento do vacúolo com a conseqüente compressão do núcleo e citoplasma contra a parede celular. **D, E**, idioblasto evidenciando o citoplasma completamente degradado e a deposição de material com coloração rosada no interior do vacúolo. **F**, idioblasto evidenciando o fracionamento do material depositado no vacúolo (conteúdo rosa) e o início da deposição de fenólicos (conteúdo esverdeado). **G**, idioblasto totalmente diferenciado e repleto de secreção. **H**, idioblasto em folhas senescentes com retração de secreção. **I**, idioblasto correspondente à figura A, evidenciando o citoplasma repleto de lipídios. **J**, idioblasto correspondente às figuras B-E, com lipídios em torno do vacúolo. **K**, idioblasto correspondente à figura F, evidenciando a célula quase repleta de lipídios. **L**, idioblasto correspondente à figura G, com seu interior repleto de lipídios. Seta, provável região da cúpula. Barra: A-D, I-J, 10 μ m; E-H, K-L, 20 μ m.

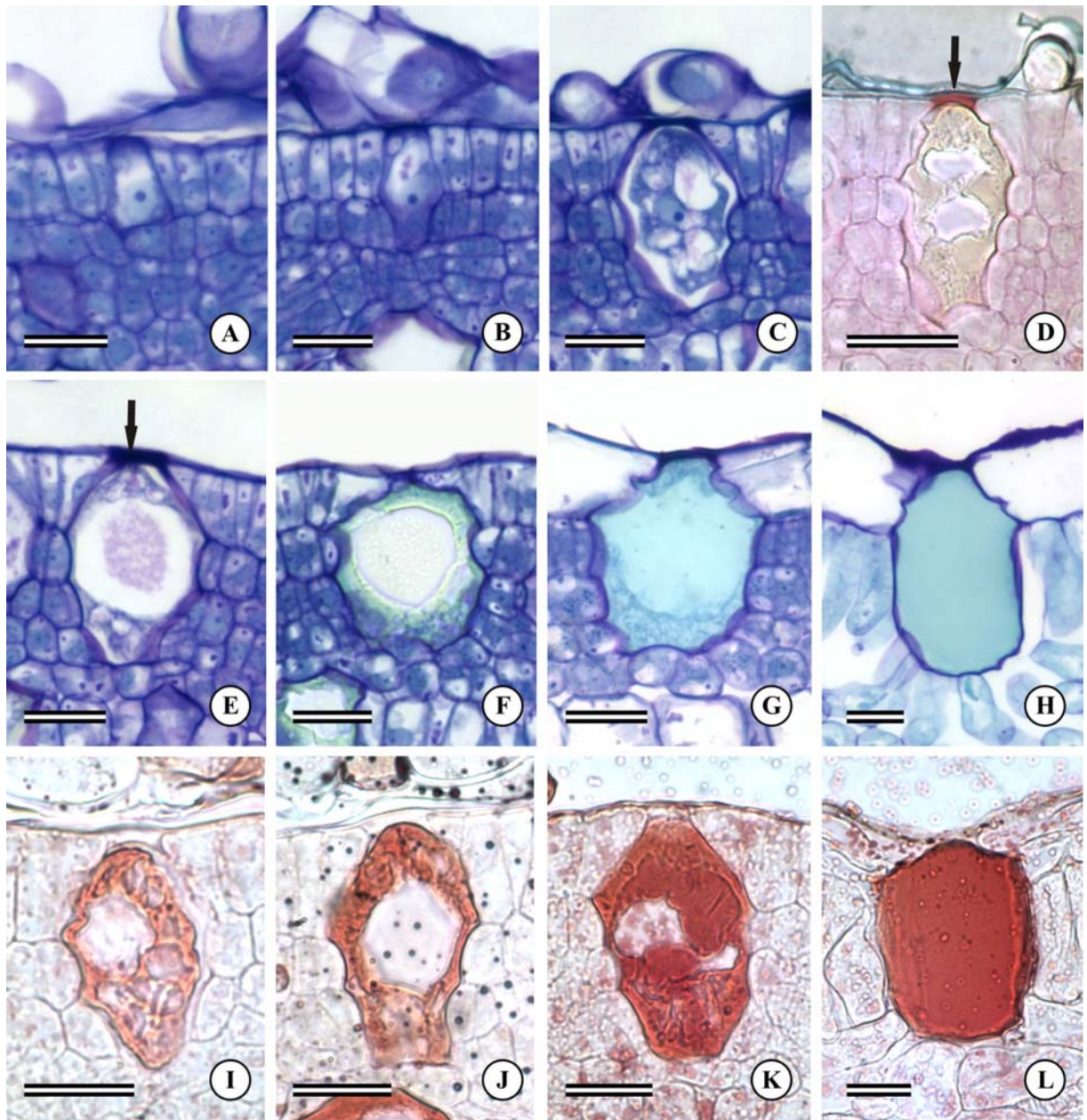


Figura 3: Fotomicrografias de seções transversais dos idioblastos da região intervenal de folhas de *P. umbellata* em diferentes fases de desenvolvimento. **A-C, E-H**, coloração com azul de toluidina; **D**, coloração com vermelho de Rutênio; **I-L**, coloração com Sudan escarlate. **A**, idioblasto em sua fase inicial de desenvolvimento. **B, C**, idioblasto evidenciando o crescimento intrusivo em meio às células do parênquima clorofiliano. **D**, idioblasto correspondente às figuras B e C, com a parede periclinal externa rica em pectinas coradas de rosa. **E**, idioblasto com citoplasma completamente degradado e com material rosado no interior do vacúolo. **F**, idioblasto evidenciando o início da deposição de fenólicos (conteúdo esverdeado). **G**, idioblasto quase completamente diferenciado com secreção e restos de citoplasma. **H**, idioblasto diferenciado repleto de secreção. **I**, idioblasto correspondente à figura C, evidenciando o citoplasma repleto de lipídios. **J**, idioblasto correspondente às figuras E, com lipídios em torno do vacúolo. **K**, idioblasto correspondente à figura F, evidenciando a célula quase repleta de lipídios. **L**, idioblasto correspondente à figura H, com seu interior repleto de lipídios. Seta, provável região da cúpula. Barra: A-L, 20µm.

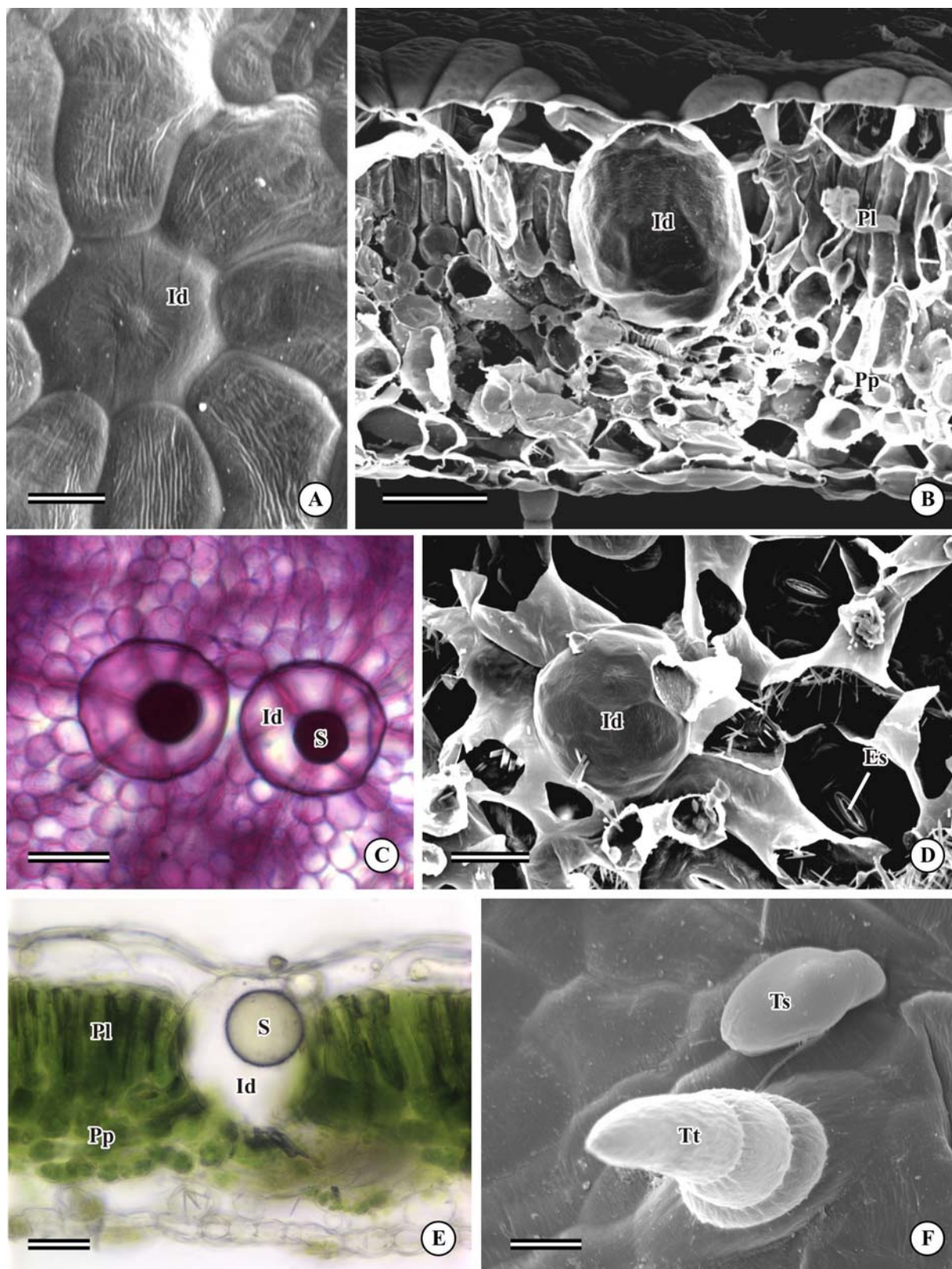


Figura 4: Eletromicrografias de varredura (A, B, D, F) e fotomicrografias (C, E) de seções parádemicas (A, C, D, F) e transversais (B, E) de folhas de *P. umbellata* completamente expandidas. A, detalhe do idioblasto e das células epidérmicas que o circundam. B, aspecto geral da folha na região intervenal. C, idioblastos na região do parênquima paliçádico. D, idioblastos na região do parênquima lacunoso. E, aspecto geral da folha *in vivo*, com secreção translúcida e oleosa. F, tricomas completamente diferenciados. Es, estômato; Id, idioblasto; Pl, parênquima lacunoso; Pp, parênquima paliçádico, S, secreção; Ts, tricoma secretor; Tt, tricoma tector. Barra: A, F, 10 μ m; B, C, E, 30 μ m; D, 20 μ m.

Discussão

A partir dos resultados desse trabalho foi possível constatar que os tricomas de *P. umbellata* se desenvolvem antes de qualquer outro tecido foliar. O desenvolvimento precoce de tricomas nos primórdios foliares já é bem registrado na literatura em diversas espécies vegetais (Dayanandan & Kaufman 1976, Ascensão & Pais 1987, Silva & Machado 1999, Monteiro *et al.* 2001, Moura *et al.* 2005).

Vários estudos relacionados à ontogenia de idioblastos produtores de óleo relatam a origem dessas estruturas a partir do meristema fundamental (Scott *et al.* 1963, West 1969, Tucker 1976, Maron & Fahn 1979, Platt-Aloia *et al.* 1983, Postek & Tucker 1983, Mariani *et al.* 1989, Bakker & Gerritsen 1990, Bakker *et al.* 1991, Moura *et al.* 2005). Os idioblastos presentes nas folhas *P. umbellata* desenvolvem-se tanto do meristema fundamental como da protoderme. A origem de idioblastos oleíferos a partir da protoderme já foi registrada em *Houttuynia cordata* (Ni *et al.* 2007), no entanto, é desconhecida a situação de origem distinta dessas estruturas.

Outro aspecto peculiar no desenvolvimento dos idioblastos de *P. umbellata* é que, na região intervenal, estas células apresentam um padrão de desenvolvimento que envolve o crescimento intrusivo em direção ao meristema fundamental. Embora esse padrão de desenvolvimento tenha sido observado em *Saururus cernuus*, o crescimento intrusivo dos idioblastos observado nessa planta ocorre de forma contrária ao processo observado nos idioblastos de *P. umbellata*, ou seja, ocorre do meristema fundamental para a protoderme (Tucker 1976). Outra diferença sobre o crescimento intrusivo observado nestas duas espécies, é que em *S. cernuus* há uma retração da parte do idioblasto voltada para a hipoderme, enquanto que em *P. umbellata* não há nenhum tipo de retração.

No presente trabalho, assim como em outros trabalhos sobre a ontogenia de idioblastos com microscopia de luz (West 1969, Tucker 1976, Ni *et al.* 2007), as iniciais dos idioblastos

são precocemente reconhecíveis dado seu tamanho avantajado, o citoplasma vacuolado e a presença de núcleo e nucléolo conspícuos. O padrão de desenvolvimento dos idioblastos em *P. umbellata* também é semelhante ao padrão observado em várias espécies, tal como nas lenhosas do complexo Ranaliano estudadas por West (1969). Entretanto, ao contrário do trabalho de West (1969), nos idioblastos de *P. umbellata* não foi possível observar nitidamente a cúpula, apesar de ter sido constatado que tanto o citoplasma quanto a secreção dessas células parecem estar conectados à parede celular, assim como observado em *Saururus cernuus* (Tucker 1976). Outro aspecto que leva à sugestão da presença de uma cúpula nos idioblastos de *P. umbellata*, é o espessamento da parede periclinal externa dos idioblastos da região intervenal, cuja natureza química revelou-se rica em pectinas.

A cúpula é uma projeção da parede celular do idioblasto, através da qual se desenvolve a cavidade onde será depositado o óleo (Bakker & Gerritsen 1990, Evert 2006). Em microscopia de luz, essa estrutura é de difícil observação. A microscopia eletrônica de transmissão é a técnica mais apropriada para o estudo da cúpula, da parede celular e da cavidade de secreção dos idioblastos. Estudos ultra-estruturais afirmam que a parede do idioblasto geralmente é composta de três camadas: uma externa celulósica, uma intermediária suberizada e outra interna, celulósica, a partir da qual a cúpula é formada (Maron & Fahn 1979, Platt-Aloia *et al.* 1983, Mariani *et al.* 1989, Bakker & Gerritsen 1990, Bakker *et al.* 1991, Platt & Thomson 1992).

Contudo, existem trabalhos ultra-estruturais que relatam a ausência da camada interna celulósica e da cúpula em idioblastos (Postek & Tucker 1983). Portanto, apesar dos estudos com microscopia de luz sugerirem que nos idioblastos de *P. umbellata* talvez ocorra a formação da cúpula, ainda é necessário um estudo ultra-estrutural para confirmar a hipótese da presença dessa estrutura e da parede terciária nos idioblastos desta espécie.

A presença da camada intermediária suberizada foi observada por vários autores mediante análise com microscopia de luz, através do uso de reagentes como o Sudan III e IV

(Scott *et al.* 1963) e com a microscopia eletrônica de transmissão (Scott *et al.* 1963, Maron & Fahn 1979, Platt-Aloia *et al.* 1983, Mariani *et al.* 1989, Bakker & Gerritsen 1990, Bakker *et al.* 1991). O estudo histoquímico com o Sudan não detectou essa camada suberizada nos idioblastos em *P. umbellata*, assim como em *Saururus cernuus* (Tucker 1976), em várias lenhosas do complexo Ranaliano (West 1969) e em *Magnolia grandiflora* (Postek & Tucker 1983). No entanto, com exceção dos estudos realizados com *M. grandiflora*, em todas essas outras espécies ainda não foram realizados estudos com microscopia eletrônica de transmissão para confirmar a presença dessa camada suberizada. Em *M. grandiflora*, a camada suberizada é observada somente em alguns idioblastos e em algumas partes da parede celular (Postek & Tucker 1983).

Segundo alguns autores (Maron & Fahn 1979, Platt-Aloia *et al.* 1983), os plasmodesmos que conectam os idioblastos a outros tipos celulares são obstruídos ao longo de seu desenvolvimento e esta obstrução parece estar relacionada com a deposição da camada de suberina e da camada terciária sobre sua parede celular. Dessa forma, o idioblasto, selado, perde sua capacidade de trocas com as células vizinhas e é fadado à morte. Esse fato também pode estar relacionado ao isolamento do conteúdo do idioblasto, o qual algumas vezes pode ser tóxico para a própria planta.

Com as colorações e os testes histoquímicos realizados nos idioblastos de *P. umbellata*, não foi possível determinar a natureza química do material rosado depositado no vacúolo dessas células. O que se pode afirmar, é que esse depósito não se trata de lipídios, mucilagens ou fenólicos e que a síntese desse material é discreta e representa apenas uma fase transitória, ocorrendo durante o processo de diferenciação dos idioblastos.

Entretanto, os lipídios foram bem marcados nos idioblastos desta espécie pelo uso do Sudan escarlate. Nos idioblastos *P. umbellata* foi observado que os lipídios inicialmente se localizam no citoplasma, e, em seguida, vão ocupando o interior do grande vacúolo formado até preencherem todo o volume celular. Alguns estudos relatam que os lipídios, depois de

sintetizados por diversas organelas citoplasmáticas, são prontamente depositados entre a membrana plasmática e a parede celular do idioblasto, sendo essa região denominada de espaço extraplasmático (Maron & Fahn 1979, Bakker & Gerritsen 1990). Em *P. umbellata*, o local final de deposição dos lipídios foi denominado de vacúolo e não de espaço extraplasmático, uma vez que esse último é caracterizado pela presença da cúpula. No entanto, estudos de microscopia eletrônica de transmissão devem ser realizados a fim de determinar se essa região se trata de um grande vacúolo ou de um espaço extraplasmático.

Como os idioblastos de *P. umbellata* completam seu desenvolvimento antes das outras células do mesófilo, sua ontogenia não pode ser correlacionada com a diferenciação das demais células e tecidos de suas folhas. Esse fato é comum em outras espécies, tais como *Persea americana* (Scott *et al.* 1963, Platt-Aloia 1983), *Laurus nobilis* (Maron & Fahn 1979), *Magnolia grandiflora* (Postek & Tucker 1983), *Liriodendron tulipifera* (Mariani *et al.* 1989) e *Annona muricata* (Bakker & Gerritsen 1990), cujos idioblastos não seguem os estádios ontogênicos de seus respectivos órgãos.

O processo de lise dos idioblastos já foi registrado por West (1969) em *Magnolia virginiana* e em outras lenhosas do complexo Ranaliano. Em *M. virginiana*, a lise dos idioblastos e das células adjacentes ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento, a qual resulta na formação de uma cavidade na folha adulta. Em *P. umbellata* não há lise dos idioblastos e a secreção permanece até a senescência da folha, não havendo liberação para o ambiente.

Alguns trabalhos relacionam a presença de idioblastos à defesa química nas folhas em diferentes fases de desenvolvimento (Lersten & Curtis 1998, Moura *et al.* 2005, Ni *et al.* 2007). Como os idioblastos de *P. umbellata* apresentam secreção desde a folha meristemática até a senescente, pode-se sugerir que essas estruturas tenham um papel de defesa química contra herbívoros e patógenos ao longo de toda a vida da folha.

Conclusões

A origem dos idioblastos no limbo foliar de *P. umbellata* pode ocorrer tanto da protoderme como do meristema fundamental nas nervuras e, exclusivamente, da protoderme na região intervenal do limbo. O desenvolvimento dessa estrutura secretora ocorre precocemente nos primórdios foliares, e a diferenciação não é sincronizada com a diferenciação das demais células e tecidos foliares. Apesar da origem precoce, a secreção no idioblasto é mantida até a senescência foliar, o que sugere para essa estrutura um papel de proteção da folha ao longo de toda sua vida.

A despeito da observação de uma conexão do citoplasma e do secretado com a parede celular do idioblasto, estudos de microscopia eletrônica de transmissão ainda são necessários para confirmar a presença das três camadas na parede celular e da cúpula, bem como para determinar os processos de síntese e acúmulo do secretado.

Referências Bibliográficas

- Albiero ALM, Paoli AAS, Souza LA, Mourão KSM. 2005a.** Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* **19**(2):305-312.
- Albiero ALM, Souza LA, Mourão KSM, Almeida OJG, Lopes WAL. 2005b.** Morfoanatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense* **24**(4):550-554.
- Albiero ALM, Paoli AAS, Souza LA, Mourão KSM. 2006.** Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **16**(3):379-391.
- Ascensão L, Pais MSS. 1987.** Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette* **148**(2):221-227.
- Bakker ME, Gerritsen AF. 1990.** Ultrastructure and development of oil idioblasts in *Annona muricata* L. *Annals of Botany* **66**:673-686.

- Bakker ME, Gerritsen AF, Van Der Schaaf PJ. 1991.** Development of oil and mucilage cells in *Cinnamomum burmanni*. An ultrastructural study. *Acta Botanica Neerlandica* **40**(4):339-356.
- Brundrett MC, Kendrick B, 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.
- Castro MM, Machado SR. 2003.** Células e tecidos secretores. In *Anatomia Vegetal* (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, eds.). Viçosa: Editora UFV.
- Cicarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 2001.** Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**:637-644.
- Cronquist A. 1981.** *An integrated system of classification of flowering plants*. 2.ed. New York: Columbia Univ. Press.
- Dasgupta A, Datta PC. 1980.** Medicinal species of *Piper*, pharmacognostic delimitations. *Quarterly Journal of Crude Drug Research* **18**(1):17-25.
- Dayanandan P, Kaufman PB. 1976.** Trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *American Journal of Botany* **63**(5):578-591.
- Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS. 2002.** Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**:69-91.
- 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: Jonh Wiley & Sons, Inc.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A. 1990.** *Plant Anatomy*. 4.ed. Jerusalem: Butterworth Heinemann.
- Fouqué A. 1980.** Les plantes médicinales présentes en Forêt Guyanaise. *Fruits* **35**(12):759-768.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 2002.** *Plants systematics: a phylogenetic approach*. 2 ed. Massachussets: Sinauer Associates, Inc.
- Kalachanis D, Psaras GK. 2005.** Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. *Biologia Plantarum* **49**(1):105-110.
- Lersten NR, Curtis JD. 1998.** Foliar idioblasts in *Physostegia virginiana* (Lamiaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society* **125**(2):133-137.

- Liang S, Wu H, Lun X, Lu D. 2006.** Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) swingle. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**(5):573-583.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002.** *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Mariani P, Cappelletti EM, Campoccia D, Baldan B. 1989.** Oil cell ultrastructure and development in *Liriodendron tulipifera* L. *Botanical Gazette* **150**(4):391-396.
- Maron R, Fahn A. 1979.** Ultrastructure and development of oil cells in *Laurus nobilis* L. leaves. *Botanical Journal of the Linnean Society* **78**:31-40.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*. Menlo Park/California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Mohandas KK, Shah GL. 1982.** Structure and ontogeny of trichomes in some Piperaceae. *Acta Botanica Indica* **10**:92-95.
- Monteiro WR, Castro MM, Mazzoni-Viveiros SC, Mahlberg PG. 2001.** Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica* **24**(3):349-357.
- Moraes MS, Oliveira F, Akisue MK, Akisue G, Mancini B. 1985.** Morfodiagnose da droga pariparoba. *Revista de Ciências Farmacêuticas de São Paulo* **7**:27-37.
- Moraes MS. 1986.** Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **1**(1):101-108.
- Moraes MS, Oliveira F, Mancini B, Akisue MK, Akisue G. 1986/1987.** Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba – *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Revista de Ciências Farmacêuticas de São Paulo* **8/9**:77-90.
- Moraes MS. 1999.** *Caracterização morfo-anatômica e fitoquímica da “caápeba do Norte” Pothomorphe peltata (L.) Miq. – Piperaceae*. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.
- Mors WB, Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira NA. 2000.** Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* **55**:627-642.
- Moura MZD, Isaias RMS, Soares GLG. 2005.** Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**:427-431.
- Ni X, Peng L, Liu W. 2007.** Structures, components and functions of secretory tissues in *Houttuynia cordata*. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(12):1734-1745.

- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**:368-373.
- Pereira NA, Jaccoud RJS, Mors WB. 1996.** Triaga Brasileira: renewed interest in a seventeenth-century panacea. *Toxicon* **14**(5):511-516.
- Pessini GL, Albiero ALM, Mourão KSM, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DAG. 2003.** Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. *Acta Farmacêutica Bonaerense* **22**(3):209-216.
- Platt KA, Thomson WW. 1992.** Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry and biochemistry. *International Journal of Plant Sciences* **153**(3):301-310.
- Platt-Aloia KA, Oross JW, Thomson WW. 1983.** Ultrastructural study of the development of oil cells in the mesocarp of avocado fruit. *Botanical Gazette* **144**(1):49-55.
- Postek MT, Tucker SC. 1983.** Ontogeny and ultrastructure of secretory oil cells in *Magnolia grandiflora* L. *Botanical Gazette* **144**(4):501-512.
- Scott FM, Bystrom BG, Bowler E. 1963.** *Persea americana*, mesocarp cell structure, light and electron microscope study. *Botanical Gazette* **124**:423-428.
- Silva EMJ, Machado SR. 1999.** Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **22**(2):117-124.
- Solereeder H. 1908.** *Systematic Anatomy of the Dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany*. v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Souza LA, Moscheta IS, Oliveira JHG. 2004.** Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii* C. DC., *Ottonia martiana* Miq. and *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae). *Gayana Botanica* **61**(1):6-17.
- Svoboda K, Hampson J, Hunter T. 1998/1999.** Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. *The International Journal of Aromatherapy* **9**(3):124-131.
- Tucker SC. 1976.** Intrusive growth of secretory oil cells in *Saururus cernuus*. *Botanical Gazette* **137**(4):341-347.
- Vianna WO, Akisue G. 1997.** Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. *Lecta* **15**(1/2):11-62.
- West, WC. 1969.** Ontogeny of oil cells in the woody Ranales. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **96**(3):329-344.

CONCLUSÕES GERAIS

A anatomia e histoquímica da folha de *P. umbellata* indicam que esse órgão é mecanicamente muito frágil, e a defesa da planta é prioritariamente química, haja vista a grande quantidade de estruturas secretoras e metabólitos secretados. A grande variedade de metabólitos identificados nas estruturas secretoras pode estar relacionada às diversas atividades terapêuticas atribuídas à espécie.

Com os estudos ontogênicos foi possível determinar que a origem dos idioblastos no limbo foliar de *P. umbellata* é distinta, se originando da protoderme e do meristema fundamental nas nervuras e exclusivamente da protoderme na região intervenal. O desenvolvimento dessa estrutura secretora ocorre precocemente nos primórdios foliares, sendo que sua diferenciação não é sincronizada com a diferenciação das demais células e tecidos do mesofilo. Apesar da origem precoce, a secreção no idioblasto é mantida até a senescência foliar, o que sugere para essa estrutura um papel de proteção da folha ao longo de toda sua vida.

Entretanto, estudos de microscopia eletrônica de transmissão devem ser realizados nos idioblastos em diferentes fases de desenvolvimento a fim de conhecer sua ultra-estrutura e determinar os processos de síntese e secreção dos metabólitos secundários produzidos.