UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinoideae)

Juliana Foresti Milani

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinoideae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS.

Área de Concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Juliana Foresti Milani
Orientadora: Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Milani, Juliana Foresti

Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinoideae). Ribeirão Preto, 2009.

61 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Teixeira, Simone de Pádua

1. *Copaifera*. 2. Anatomia. 3. Cavidade secretora. 4. Óleo-resina. 5. Ultraestrutura.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Foresti Milani

Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinoideae).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS.

Área de Concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus familiares e amigos que me apoiaram nessa fase tão importante da minha vida. Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado a graça de ingressar na pós-graduação e por ter me ajudado a seguir o caminho correto para vencer os obstáculos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio estrutural e aos professores que com seu conhecimento ajudaram na minha formação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa durante o ano de 2009, dando suporte para realização do meu projeto.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira que além de orientadora e excelente profissional também se mostrou amiga e companheira nesses dois anos de parceria.

Ao Joecildo Francisco Rocha pela ajuda na coleta de material, pelo uso do laboratório para realização dos testes histoquímicos e pelas dicas que engrandeceram meu trabalho.

À Silvia Rodrigues Machado e Tatiane Maria Rodrigues pelo auxílio nas análises ultraestruturais.

Ao Emerson Ricardo Pansarin e Milton Groppo pela participação no exame de qualificação e pelo enriquecimento do trabalho.

Ao Fernando Batista da Costa, assessor do trabalho, pelas sugestões.

À Karen Lúcia Gama De Toni e Massimo Giuseppe Bovini pela disponibilidade de auxilio na coleta do material no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e do uso do laboratório.

À Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca) e José Augusto Maulin do laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) pelo apoio técnico na preparação e processamento do material.

Ao Edimárcio da Silva Campos, técnico do laboratório de Botânica, por sempre estar disponível em ajudar no que for preciso.

À Rossana Ribeiro pela atenção e dedicação todas as vezes que a procurei na secretaria para tirar dúvidas.

Aos amigos do laboratório de Botânica: Camila Devicaro, Cristina Marinho, Giseli Pedersoli, João Paulo Alves, Juliana Paulino, Liana Capucho, Marina Bortolin, Tatiane Martins e Viviane Leite agradeço pelo apoio, pela ajuda nas coletas e nos procedimentos do laboratório, pelas conversas e confidências. Em especial gostaria

de citar Thais Cury, minha irmã de coração que esteve comigo em todos os momentos nesses dois anos de mestrado e que me adotou como parte da família.

Aos meus pais Silvio e Rachel pelo amor, educação, carinho, paciência, respeito e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Matheus que mesmo ausente se fez presente pela cumplicidade e amizade.

Aos meus avós maternos e paternos e ao meu tio-avô pelo exemplo de caráter, sabedoria e generosidade. Aos meus tios e tias, primos e primas pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos, principalmente Ana Paula Araki agradeço pela compreensão quando estive ausente.

Todos aqui citados fizeram parte dessa conquista. Sem vocês eu não teria alcançado esse objetivo. Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT iii
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVO 6
3. MATERIAL E MÉTODOS 7
4. RESULTADOS 10
4.1 Distribuição e morfologia 10
4.2 Secreção 11
4.3 Desenvolvimento 12
5. DISCUSSÃO 26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

RESUMO

MILANI, J.F. **Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinoideae).** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As copaíbas, pertencentes à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, são conhecidas pela produção de uma óleo-resina com propriedades antiinflamatórias, utilizada na medicina popular e pela indústria farmacêutica. A substância é retirada do tronco da árvore, através do uso de um trado que perfura o caule até que a óleo-resina escorra. Esta óleo-resina parece ser produzida, armazenada e secretada por dois tipos de estruturas secretoras, os canais e as cavidades secretores. Embora muitos trabalhos tratem das análises químicas e das atividades biológicas da óleo-resina de espécies de *Copaifera*, poucos são os que tratam dos mecanismos subcelulares da produção, do armazenamento e da secreção da óleo-resina. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente a distribuição, a morfologia, o desenvolvimento e o conteúdo secretor dos canais e/ou cavidades secretores de óleo-resina no caule e na folha de *Copaifera trapezifolia* Hayne, única dentre as 35 espécies do gênero que ocorre na Floresta Atlântic*a*. Foi testado se os canais e/ou cavidades secretores produzem óleo-resina na folha, assim como relatado para o caule, a fim de propor alternativas para a utilização do tronco da árvore como fonte da secreção. Como a natureza química da secreção já é conhecida para o caule, o estudo ultraestrutural visa relacionar as populações de organelas às substâncias produzidas, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos de produção e secreção de óleo-resina pelas células epiteliais secretoras dos canais e/ou cavidades. Para tal, gemas axilares contendo primórdios foliares e caulinares e folíolos medianos completamente expandidos foram coletados de três indivíduos no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e processados para estudos anatômicos, de histolocalização de óleo-resina, ultra-estruturais e de diafanização de folhas inteiras. Os dados indicam que estruturas com forma isodiamétrica, denominadas cavidades secretoras, ocorrem na folha e no caule em estrutura primária e secundária. Na lâmina foliar, estão localizadas entre os parênquimas paliçádico e lacunoso e na

face abaxial da nervura central; no pecíolo as cavidades ocorrem no córtex; no caule ocorrem imersas nos parênquimas cortical e medular. Originam-se de células do meristema fundamental, a partir de uma divisão periclinal seguida de duas anticlinais; o lúmen é originado por esquizogenia. O conteúdo das cavidades tanto do caule como da folha contém óleo e resina, conforme consta na literatura para o gênero. Isto permite inferir que a extração da óleo-resina seria menos prejudicial para a planta se extraída da folha. A presença de um epitélio bisseriado na folha e no caule, assim como o que foi encontrado em *C. langsdorffii*, constitui um dado inédito para Leguminosae e, provavelmente, representa a reposição das células epiteliais que já secretaram. As células epiteliais, no início da produção dos metabólitos, são polarizadas: núcleo próximo à parede periclinal interna e citoplasma próximo à parede periclinal externa. O citoplasma é rico em mitocôndrias e retículos endoplasmáticos liso e rugoso, associados a vesículas (folha) ou plastídeos (caule). Vesículas de conteúdo distinto (elétron-denso e elétron-opaco) são produzidas nos retículos, transportadas por entre as microfibrilas das paredes anticlinal e periclinal interna e liberadas para o lúmen. Produção e secreção de metabólitos para o lúmen não são sincronizadas nas células epiteliais de uma mesma cavidade. Sugere-se que o componente resinoso seja produzido nos retículos rugosos e plastídeos, e o oleoso nos retículos lisos. A comparação entre *C. langsdorffii* e *C. trapezifolia* utilizando caracteres com valor diagnóstico representa um resultado pioneiro se considerado o grande número de espécies e morfo-espécies do gênero. No entanto, a inclusão de um maior número de espécies nos estudos de estruturas secretoras de *Copaifera* permitiriam auxiliar a delimitação infragenérica do grupo.

Palavras-chave: *Copaifera*, anatomia, cavidade secretora, óleo-resina, ultraestrutura.

ABSTRACT

MILANI, J.F. **Secretory cavities in the aerial vegetative organs of *Copaifera trapezifolia* Hayne (Leguminosae, Caesalpinioideae).** 2010. 61 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Copaíbas (Leguminosae, Caesalpinioideae) are best known for the production of an oilresin with anti-inflammatory properties, used in the folk medicine and pharmaceutical industry. The substance is usually taken from the stem, through the use of an auger to drill the stem until the oilresin drips. This oilresin seems to be produced, stored and secreted by two types of secretory structures, canals and secretory cavities. Although many studies address the chemical analysis and the biological activity of the oilresin in species of *Copaifera*, the cellular mechanisms of production, storage and secretion have rarely been exploited. The objective of this study was to compare the distribution, morphology, development and secretion biology of oilresin-secreting canals and/or cavities, in the stem and in the leaf of *Copaifera trapezifolia* Hayne, unique among the 35 species of the genus that occurs in the Atlantic Rain Forest. The study tested wheather canals and/or cavities produce oilresin in the leaf, as reported to the stem, in order to propose alternatives to the use of the trunk of the tree as a source of secretion. Considering that the chemical nature of the secretion is already known to the stem, the ultrastructural study of canal/cavity in several stages of development aim at to associate subcellular components with substances produced and secreted. Data obtained can increase the knowledge on the production and secretion mechanisms of within epithelial cells of secretory canals and/or cavities. Materials include axillary buds containing leaf and stem primordial, besides mature middle leaflets and portions of stem in primary and secondary growth. They were collected from three individuals in the Botanic Garden of Rio de Janeiro and prepared to be employed in anatomy, histolocalization of oilresin, ultrastructure and clearing of whole leaves. Secretory cavities were observed in the leaf and the stem (primary and secondary growth), between the palisade and spongy mesophyll, petiole cortex, and shoot cortex and pith. Cavities originate from ground meristem cells by a periclinal division followed by two anticlinals; the lumen is formed

by esquizogenous process. The content of the cavities of both the stem and leaf contains oil and resin, as shown in the literature for the genus. This suggests that the extraction of the oleoresin would be less harmful for the plant if extracted from the leaf. The presence of a biseriate epithelium in foliar and shoot cavities, as similarly found in *C. langsdorffii*, is a novelty for Leguminosae, and probably represents the replacement of epithelial cells that have secreted. In the beginning of substance production epithelial cells are polarized: nucleus near the inner periclinal wall and cytoplasm near the outer periclinal wall. The cytoplasm is rich in mitochondria, and smooth and rough endoplasmic reticulum associated to vesicles (leaf) or plastids (stem). There is a greater amount of smooth endoplasmic reticulum in cells of the leaf cavities and rough endoplasmic reticulum in cells of the stem cavities. Vesicles with different content (electron-dense and electron-opaque) are produced by the reticulum, transported through microfibrils of anticlinals and inner periclinal walls and released into the lumen. Production and secretion of metabolites are not synchronized in epithelial cells of the same cavity. It is suggested that the resin component is produced in the rough reticulum and plastids, and the oily component in the smooth reticulum. The comparison between *C. langsdorffii* and *C. trapezifolia* using characters with diagnostic value represents a pioneer result if considered the number of species and morpho-species of the genus. However, the inclusion of a greater number of species in studies of secretory structures of *Copaifera* would certainly help the complex infrageneric division of this group.

KEYWORDS*:* *Copaifera*, anatomy, secretory cavity, oleoresin, ultraestructure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Método usado para a extração da óleo-resina de *Copaifera*.....2

Figuras 2-4. Localização e forma das cavidades secretoras (setas) na lâmina foliar diafanizada de *Copaifera trapezifolia*.....14

Figuras 5-9. Localização das cavidades secretoras na lâmina foliar, no pecíolo e no caule em estrutura primária e secundária seccionados de *Copaifera trapezifolia*.....15

Figuras 10-13. Cavidades secretoras adultas em gemas axilares seccionadas de *Copaifera trapezifolia*.....16

Figuras 14-19. Conteúdo secretor das cavidades secretoras da lâmina foliar (14-17) e do pecíolo (18-19) de *Copaifera trapezifolia*.....17

Figuras 20-24. Conteúdo secretor das cavidades secretoras no córtex e na medula do caule em estrutura primária (20-21) e em início de estrutura secundária (22-24) de *Copaifera trapezifolia*.....18

Figuras 25-28. Conteúdo das células epiteliais das cavidades secretoras foliares (25-26) e caulinares (27-28) de *Copaifera trapezifolia*.....19

Figura 29. Desenho esquemático dos planos de divisão das células do meristema fundamental que originam as cavidades secretoras de *Copaifera trapezifolia*.....20

Figuras 30-35. Ontogenia das cavidades secretoras foliares de *Copaifera trapezifolia* (seccionamento transversal).....20

Figuras 36-40. Ontogenia das cavidades secretoras caulinares de *Copaifera trapezifolia* (seccionamento transversal).....21

Figuras 41-43. Eletromicrografias (MET) das cavidades secretoras caulinares (41-42) e foliares (43) de *Copaifera trapezifolia* antes da formação do lúmen.....22

Figuras 44-47. Eletromicrografias (MET) das cavidades secretoras caulinares de *Copaifera trapezifolia* em vários estádios de desenvolvimento.....23

Figuras 48-53. Eletromicrografias (MET) das células epiteliais de cavidades secretoras foliares (48-50, 52) e caulinares (51, 53) de *Copaifera trapezifolia*, durante a produção (48-50) e liberação (51-53) da óleo-resina.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes de localização da óleo-resina aplicados às cavidades secretoras dos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia*.....11

Tabela 2. Caracteres relacionados às estruturas secretoras que apresentam valor diagnóstico para *Copaifera langsdorffii* e *C. trapezifolia*.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE: Célula epitelial

CE2: Célula epitelial da segunda camada

d: Dictiossomo

LM: Lamela média

LU: Lúmen

M: Molar

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

N: Núcleo

P: Parede celular

p: plastídeo

PE: Parede celular externa

PI: Parede celular interna

R: Retículo endoplasmático liso

RE: Retículo endoplasmático rugoso

V: Vesícula

V1: Vesícula com conteúdo elétron-denso

V2: Vesícula com conteúdo elétron-opaco

1. INTRODUÇÃO

A família Leguminosae é a terceira maior família de Angiospermae (POLHILL et al., 1981) com aproximadamente 730 gêneros e 19.325 espécies, que variam de árvores emergentes até ervas diminutas e efêmeras (LEWIS et al., 2005). No Brasil, ocorrem aproximadamente 188 gêneros e cerca de 2.100 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetacionais (BARROSO et al., 1991; LIMA, 1995). É dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, sendo que Caesalpinioideae compreende 171 gêneros e 2.250 espécies (LEWIS et al., 2005).

Dentre os gêneros incluídos em Caesalpinioideae, *Copaifera,* com 35 espécies (LEWIS et al., 2005), destaca-se por sua importância econômica (VEIGA et al., 2007). Estão distribuídas na África e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, principalmente no Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia (VEIGA Jr.; PINTO, 2002). Atualmente são registradas cerca de 28 espécies no Brasil das quais 16 são endêmicas (CAMARGOS et al., 1996).

As plantas do gênero *Copaifera* são popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo (PIO CORRÊA, 1984) e possuem, em geral, altura de 10 a 40 metros, folhagem densa e constituída de folhas compostas pinadas, alternas, com folíolos coriáceos de 3-6 cm de comprimento (LORENZI, 2008). As flores são pequenas, os frutos secos, do tipo legume monospérmico e deiscente e as sementes são escuras, ovóides (ALENCAR, 1981; CRESTANA; KAGEYAMA, 1989), com um arilo que apresenta variações de cor podendo ser amarelo (LORENZI, 1992) ou vermelho-alaranjado (COSTA; QUEIROZ, 2007).

As copaíbas fornecem uma óleo-resina por perfuração do tronco, principalmente *Copaifera langsdorffii*, *C. officinalis* e *C reticulata* (PIO CORRÊA, 1984; VEIGA et al., 1997), cujo interesse se deve ao seu uso variado na medicina popular, principalmente como cicatrizante e antiinflamatório (SAMPAIO, 2000). Esta substância é obtida através do uso de um trado no tronco da árvore (Figura 1), método que substituiu o corte lateral com machado ou motosserra (ALENCAR, 1982). *C. langsdorffii* também pode ser utilizada para plantio em áreas degradadas e de preservação permanente (LORENZI, 1992).

Figura 1: Método usado para a extração da óleo-resina de *Copaifera*.

A óleo-resina é rica em sesquiterpenos, principalmente diterpenóides (BRAGA et al., 1998; MONTI et al., 1999). Ela pode ser usada pura ou como componente na preparação de uma variedade de produtos terapêuticos e cosméticos. O óleo essencial é extraído por destilação e com aromas marcantes, utilizados pela indústria de perfumes (SAMPAIO, 2000; VEIGA Jr.; PINTO, 2002). O ácido copálico, por exemplo, é usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA et al., 1997). Para as plantas do gênero, a óleo-resina parece exercer papel na defesa contra o ataque de animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982; LEITE et al., 2001).

Estruturas secretoras, classificadas como canais secretores, parecem ser as responsáveis por produzir, armazenar e secretar a óleo-resina das Copaíbas (MARCATI et al., 2001; VEIGA Jr.; PINTO, 2002). Os canais secretores são caracterizados como estruturas alongadas longitudinalmente, de localização profunda nos órgãos vegetais, constituídos de um epitélio secretor que delimita um lúmen. A secreção é produzida nas células do epitélio e enviada para o lúmen, onde fica armazenada (FAHN, 1979). No entanto, além de canais, cavidades secretoras (estruturas semelhantes aos canais, mas com lúmen isodiamétrico) também foram observadas em plântulas e indivíduos jovens (em estrutura primária) de *Copaifera langsdorffii* em trabalho recente de Rodrigues (2008).

Canais e cavidades secretores podem ser originados por dissolução de células (processo lisígeno) ou por sua separação (processo esquizógeno). No processo lisígeno, células parcialmente desintegradas aparecem ao longo da periferia do lúmen; no processo esquizógeno o lúmen é geralmente delimitado por células intactas (ESAU, 1974). Há ainda o processo esquizo-lisígeno em

que a estrutura inicia sua formação esquizogenamente, mas, durante o desenvolvimento, as células do epitélio secretor sofrem autólise, após a ampliação do lúmen (TURNER et al., 1998).

Canais secretores ocorrem com freqüência nas famílias Anacardiaceae – *Anacardium humile*, *Lithraea molleoides*, *Spondias dulcis, Tapirira guianensis* (LACCHIA; GUERREIRO, 2009), *Schinus terebinthifolius* (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2001), *Mangifera indica* (JOEL; FAHN, 1980a), *Rhus diversiloba* (MCNAIR, 1918); Asteraceae - *Smallanthus sonchifolius* (MACHADO et al., 2004); Cactaceae – gênero *Nopalea* (MAUSETH, 1980) e, em gimnospermas, na família Pinaceae - *Pinus densiflora* (Zhang et al., 2008) e *Pinus sylvestris* (LIN et al., 2001). Já as cavidades são mais comumente encontradas em espécies de Rutaceae - clado das Rutaceae centrais (GROPPO, et al. 2008) e gênero *Citrus* (TURNER et al., 1998), e Myrtaceae – *Campomanesia adamantium, Myrcia cordiifolia, M. decrescen, M. Torta* (GOMES et al., 2009); *Eugenia uniflora* (FIUZA et al., 2008); *Pimenta pseudocaryophyllus* (PAULA et al., 2005) e *Psidium guajava* (OKATOMO et al., 2009).

Considerando a riqueza de espécies da família Leguminosae (LEWIS et al., 2005), estruturas secretoras, em geral, têm sido pouco estudadas. A ocorrência de canais (lúmen alongado) e cavidades (lúmen isodiamétrico) secretores foi registrada em espécies de *Acosmium* (ALVES; CASTRO, 2002), de *Caesalpinia sensu* Bentham (LERSTEN; CURTIS, 1994), de *Copaifera* (ALENCAR, 1982; MARCATI et al., 2001; RODRIGUES, 2008), de *Dahlstedtia* (TEIXEIRA; GABRIELLI, 2000), de *Hymenaea* (LEE; LANGENHEIM, 1975; PAIVA, MACHADO, 2007), de *Lonchocarpus* (TEIXEIRA et al., 2000), de

Myrocarpus, Myrospermum, Myroxylon (SARTORI; TOZZI, 2002), e de *Pterodon* (PAIVA et al*.,* 2008; RODRIGUES, 2008). Tais estruturas são relatadas para todos os órgãos vegetais, em especial os aéreos (PAIVA; OLIVEIRA, 2004; TEIXEIRA; GABRIELLI, 2000; TEIXEIRA et al., 2000; RODRIGUES, 2008;); originam-se de células da protoderme (TURNER, 1986; PAIVA, MACHADO, 2007) ou do meristema fundamental (TEIXEIRA; GABRIELLI, 2000; TEIXEIRA; ROCHA, 2009); a formação do lúmen é geralmente esquizógena (TURNER, 1986; MARCATI et al., 2001; TEIXEIRA; ROCHA, 2009), mas pode ocorrer lisogenia (PAIVA, MACHADO, 2007; PAIVA et al., 2008) e as células epiteliais secretoras apresentam paredes finas e pecto-celulósicas, citoplasma denso, núcleo evidente e central, e grande densidade citoplasmática (TEIXEIRA; GABRIELLI, 2000; RODRIGUES, 2008; TEIXEIRA; ROCHA, 2009).

Dentro do gênero *Copaifera*, espécies amazônicas como *C. reticulata* e *C. multijuga* são bastante estudadas quanto à produção e a composição da óleo-resina (ALENCAR, 1982; OLIVEIRA et al., 2006). Do mesmo modo, devido à ampla distribuição geográfica de *C. langsdorffii*, encontram-se vários trabalhos relacionados à sua morfologia e anatomia (MARCATI et al., 2001; RODRIGUES, 2008), sua conservação e armazenamento de suas sementes e suas propriedades medicinais (CRESTANA et al., 1989; BARBOSA et al., 1992; EIRA et al., 1992). No entanto, são poucos os trabalhos com *C. trapezifolia* Hayne, espécie exclusivamente brasileira.

Copaifera trapezifolia ocorre em uma região muito devastada, a Floresta Pluvial Atlântica, que conta apenas com 7,5% de vegetação primária (MYERS et al., 2000). A Floresta Pluvial Atlântica é considerada uma das florestas

tropicais mais ameaçadas do planeta e um dos “hotspots” da biodiversidade mundial, sendo sua conservação prioritária em nível global. Apesar de grande ameaça, ela ainda apresenta áreas de enorme importância biológica que devem ser protegidas e ampliadas (RBMA, 2003). Assim, estudos morfológicos, fisiológicos e ecológicos são muito importantes para a preservação de espécies e de seu ambiente natural. Além disso, programas de recuperação devem estar associados a outras estratégias de ordenamento territorial, como a implantação de corredores e mosaicos ecológicos, Reservas da Biosfera, gerenciamento costeiro e manejo de bacias hidrográficas, entre outros, de onde deve derivar parte importante dos recursos financeiros (LINO; BECHARA, 2002).

Como não são encontrados trabalhos que tratem da distribuição, anatomia e dos mecanismos de produção e armazenamento da óleo-resina de *C. trapezifolia*, fica comprometida a sua utilização na indústria farmacêutica, uma vez que estudos estruturais detalhados são necessários para direcionar a extração sustentável da óleo-resina na árvore, bem como subsidiar o controle de qualidade da matéria-prima empregada em escala industrial (JACOMASSI et al., 2007).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente a distribuição, a morfologia, o desenvolvimento e o conteúdo secretor dos canais e/ou cavidades secretores de óleo-resina na folha e no caule de *Copaifera trapezifolia*. Tal objetivo foi proposto tendo em vista que espécies do gênero

Copaifera secretam óleo-resina pelo tronco, apresentam canais e cavidades secretores, e estes, por sua vez, são relatados como responsáveis pela secreção e pelo armazenamento de metabólitos secundários.

Para atender o objetivo, algumas proposições foram formuladas:

1. A morfologia e o conteúdo secretor dos canais e/ou cavidades secretores foliares de *Copaifera trapezifolia* são semelhantes aos caulinares? As respostas a esta questão podem auxiliar na elaboração de propostas alternativas à utilização do tronco da árvore como fonte de óleo-resina.
2. Quais características subcelulares podem ser atribuídas às células epiteliais do canal e/ou cavidade produtor e secretor de óleo-resina? Quais alterações morfológicas subcelulares ocorrem no decorrer do desenvolvimento do canal e/ou cavidade secretor? O estudo detalhado (ultra-estrutural) envolvendo tais questões contribuirá com o conhecimento sobre a biologia da secreção de óleo-resina em plantas.

Também foram ressaltados no trabalho caracteres com valor diagnóstico que, por comparação a estudos com *C. langsdorffi* (RODRIGUES, 2008), podem auxiliar no reconhecimento de espécies de *Copaifera,* gênero com muitos problemas de circunscrição taxonômica, devido a sua grande quantidade de morfo-espécies (MARTINS-da-SILVA et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Gemas vegetativas axilares contendo primórdios foliares e caulinares, folíolos medianos completamente expandidos e ramos em início de crescimento secundário foram coletados de três indivíduos de *Copaifera trapezifolia* localizados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ. O voucher

foi depositado no Herbário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (SPFR) sob o número 12159. Esses materiais foram fixados ou utilizados frescos, de acordo com as técnicas empregadas, descritas a seguir.

A distribuição, a análise do conteúdo secretor e a caracterização anatômica das estruturas secretoras adultas foram analisadas por meio de lâminas histológicas semi-permanentes e permanentes.

As lâminas semi-permanentes foram obtidas após seccionamento a mão de folíolos e ramos frescos, coloração com Cloreto Férrico 10% para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), Sudam III 0,5% para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), mistura de Azul de Astra 1% e Safranina 1% (9:1– v/v) para polissacarídeos da parede celular (KRAUS; ARDUIN, 1997), Acetato Cúprico 7% para resina (JOHANSEN, 1940) e montagem em gelatina glicerinada. Cortes sem a utilização de corantes também foram analisados para verificar a coloração natural da secreção.

As lâminas permanentes foram obtidas após fixação do material (gemas, folíolos e ramos) em formalina com sulfato ferroso (JOHANSEN, 1940) por 24h, desidratação gradativa em série alcoólica, inclusão em parafina, seccionamento transversal (6 a 8 µm de espessura) em micrótomo rotativo Leica RM 2245, coloração com mistura de Azul de Astra 1% e Safranina 1% (9:1– v/v) (KRAUS; ARDUIN, 1997 modificado de MUKATSCH, 1972) e montagem em resina sintética Alklan.

A forma das estruturas secretoras foliares em vista frontal foi verificada em lâminas foliares inteiras, previamente fixadas em solução de Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 24h (KARNOVSKY, 1965), desidratadas gradativamente em série alcoólica, tratadas com hidróxido de sódio 5% seguido

de lavagem em água destilada, com hipoclorito de sódio 30% seguido de lavagem em água destilada, desidratadas em série gradativa álcool-xilólica, coradas com Safranina 1% em solução álcool-xilólica e montadas em resina sintética Alklan (MONTEIRO et al., 1979).

As caracterizações anatômica e ultraestrutural das estruturas secretoras em várias fases de desenvolvimento foram efetuadas em gemas axilares após fixação em solução de Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 24h (KARNOVSKY, 1965), lavagem em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 20 minutos, pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M, por 2 h, inclusão em Araldite e seccionamento transversal e longitudinal com auxílio de um ultramicrótomo Leica ultracut S Reichert. Os cortes semifinos (0,5 µm) foram corados com Azul de Toluidina 0,05% (O'BRIEN et al., 1964) e observados em microscopia fotônica.

Os cortes ultrafinos (60 a 70 nm) foram coletados em grade de malha fina, contrastados em solução aquosa de Acetato de Uranila 2% por 15 min (WATSON, 1958) e Citrato de Chumbo por 15 min (REYNOLDS, 1963) e observados em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208.

Fotomicrografias foram obtidas em um fotomicroscópio Leica DM 4500 acoplado a uma câmera digital Leica DFC 295; eletromicrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, acoplado a uma câmera digital Hamamatsu Orca HR; as escalas foram obtidas nas mesmas condições ópticas.

A terminologia adotada para as estruturas secretoras está de acordo com Fahn (1979; 1988).

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição e morfologia

A folha (Figuras 2-4) e o caule em estrutura primária e início de estrutura secundária (Figuras 7-9) de *Copaifera trapezifolia* apresentam estruturas secretoras com formato isodiamétrico, denominadas cavidades secretoras.

Na lâmina foliar foram observadas cavidades secretoras com tamanhos variados, distribuídas pelo ápice (Figura 2), próximas à margem (Figura 3) e pela região mediana (Figura 4). Em cada aréola foliar há quatro ou cinco cavidades secretoras (Figuras 2-4). As cavidades ocorrem no mesofilo, entre os parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 5). Na nervura central as cavidades estão na região cortical da face abaxial, (Figura 6) e no pecíolo estão distribuídas ao redor da nervura, no córtex (Figura 7).

No caule em estrutura primária, as cavidades secretoras estão distribuídas nas regiões cortical e medular (Figura 8).

No caule em início de estrutura secundária, as cavidades secretoras se mantêm nas regiões cortical e medular (Figura 9). Não foram observadas cavidades secretoras na região dos tecidos vasculares (Figura 9).

As cavidades secretoras adultas são constituídas por um epitélio secretor geralmente unisseriado, que delimita um lúmen isodiamétrico. Cavidades com epitélio bisseriado, derivado da divisão de células do próprio epitélio, foram observadas na folha e no caule, embora raramente (Figuras 10 e 11). As células epiteliais apresentam núcleo central e evidente, e citoplasma denso. Porém, na mesma cavidade ocorrem células epiteliais em inicio de vacuolação (Figura 10). As paredes periclinais internas das células epiteliais são mais finas

que as periclinais externas (Figura 12); plasmodesmos foram observados nas paredes anticlinais (Figura 13).

4.2 Secreção

O conteúdo secretor preenche todo o lúmen das cavidades secretoras e é semelhante na folha e no caule. Apresenta natureza mista, lipofílica e resinosa, reagindo com Sudam III e Acetato Cúprico, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Testes de localização da óleo-resina aplicados às cavidades secretoras dos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia*.

Reagente		Acetato Cúprico	Cloreto Férrico	Sudam III
Lâmina Foliar	Mesofilo	+ (Figura 14)	-	+ (Figura 16)
	Nervura central	+ (Figura 15)	-	+ (Figura 17)
Pecíolo		+ (Figura 18)	-	+ (Figura 19)
Caule (estrutura primária)	Córtex	+ (Figura 21)	-	+ (Figura 20)
	Medula	+ (Figura 21)	-	+ (Figura 20)
Caule (início de estrutura secundária)	Córtex	+ (Figura 23)	-	+ (Figura 24)
	Medula	+ (Figura 22)	-	+ (Figura 24)

Além do conteúdo armazenado no lúmen das cavidades secretoras, as células epiteliais da folha (Figuras 25-26) e do caule (Figuras 27-28) acumulam substâncias lipofílicas e fenólicas em seu citoplasma, como evidenciado pelas reações com sudam III e formalina com sulfato ferroso, respectivamente.

4.3 Desenvolvimento

As etapas de desenvolvimento das cavidades secretoras foliares (Figuras 30-35) e caulinares (Figuras 36-40) são semelhantes. As cavidades secretoras originam-se de células do meristema fundamental, tanto nos primórdios foliares quanto nos caulinares. Uma célula do meristema fundamental divide-se repetidas vezes, sendo a primeira divisão periclinal (Figura 29A, 30 e 36) e as divisões das duas células-filhas anticlinais (Figuras 29B, 29C, 31, 32, 37, 38).

A célula do meristema fundamental e suas células-filhas apresentam paredes primárias delgadas, núcleo central, lobado e citoplasma denso (Figura 41), contendo mitocôndrias (Figuras 42), retículos endoplasmáticos liso e rugoso, e plastídeos (Figura 43).

Após as três divisões que resultam na formação de quatro células (Figura 29C), ocorre a formação do lúmen, por meio de separação das células, ou seja, por esquizogênese (Figuras 33, 39, 44). Restos de lamela média podem ser observados na cavidade secretora em início de desenvolvimento (Figuras 46, 47).

À medida que o lúmen aumenta em diâmetro, as células-filhas continuam a se dividir anticlinalmente, formando um epitélio unisseriado com muitas células – cavidade adulta (Figuras 34, 40 e 45).

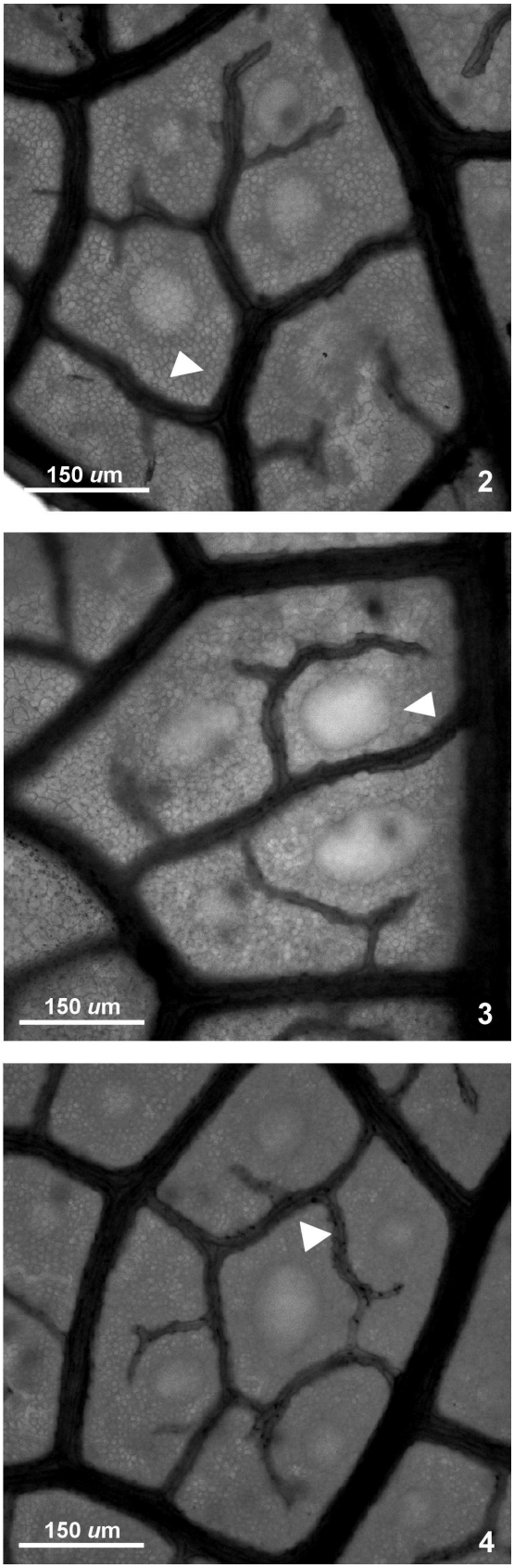
Nesta fase, as células epiteliais iniciam o processo de produção dos metabólitos, apresentando-se polarizadas: núcleo próximo à parede periclinal interna, que delimita o lúmen, e citoplasma próximo à parede periclinal externa (Figura 48). O citoplasma é rico em mitocôndrias e retículos endoplasmáticos lisos e rugosos; estes últimos formam círculos ao redor de vesículas (folha,

Figura 49) e plastídeos (caule, Figura 50). Poucos dictiossomos foram observados (Figura 50). A parede periclinal interna das células epiteliais é mais fina que a parede periclinal externa (Figura 13); a parede anticlinal apresenta microfibrilas arranjadas frouxamente (Figura 53). Ressalta-se a presença de maior quantidade de retículo endoplasmático liso nas células das cavidades foliares (Figura 43) e de retículo endoplasmático rugoso nas do caule (Figura 51).

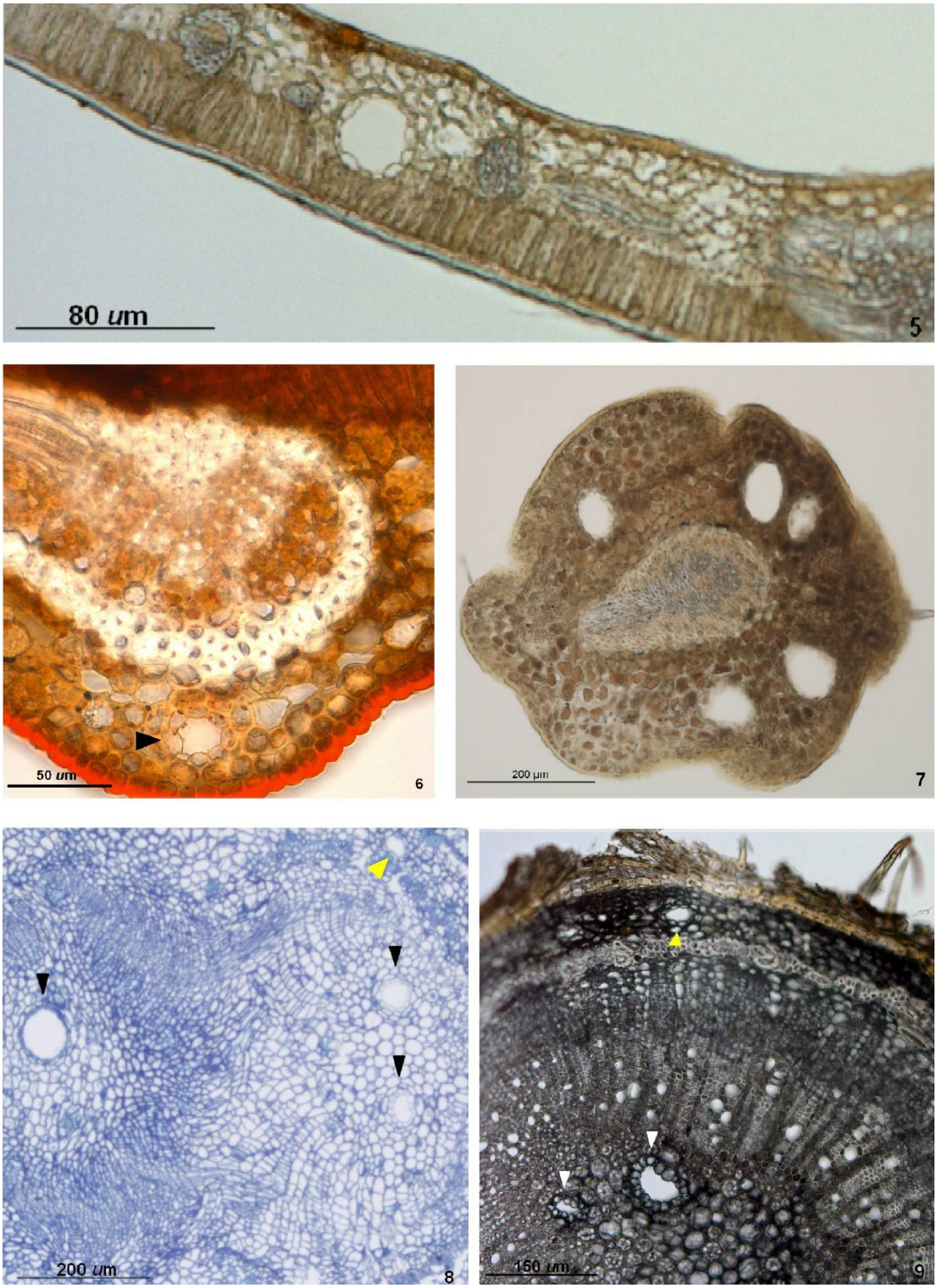
Vesículas de conteúdos distintos (elétron-densas e elétron-opacas) (Figura 51) são produzidas nos retículos, coalescem-se formando vesículas maiores, penetram as paredes celulares anticlinal e periclinal interna através de invaginação da membrana plasmática, ocorrendo fusão de membranas (Figura 52), e são transportadas entre as microfibrilas das paredes (Figura 53) em direção ao lúmen.

Quando cessam suas atividades de produção e secreção de metabólitos para o lúmen, as células epiteliais se tornam vacuoladas (Figura 35). Estes processos não são sincronizados no epitélio de uma mesma cavidade (Figura 35).

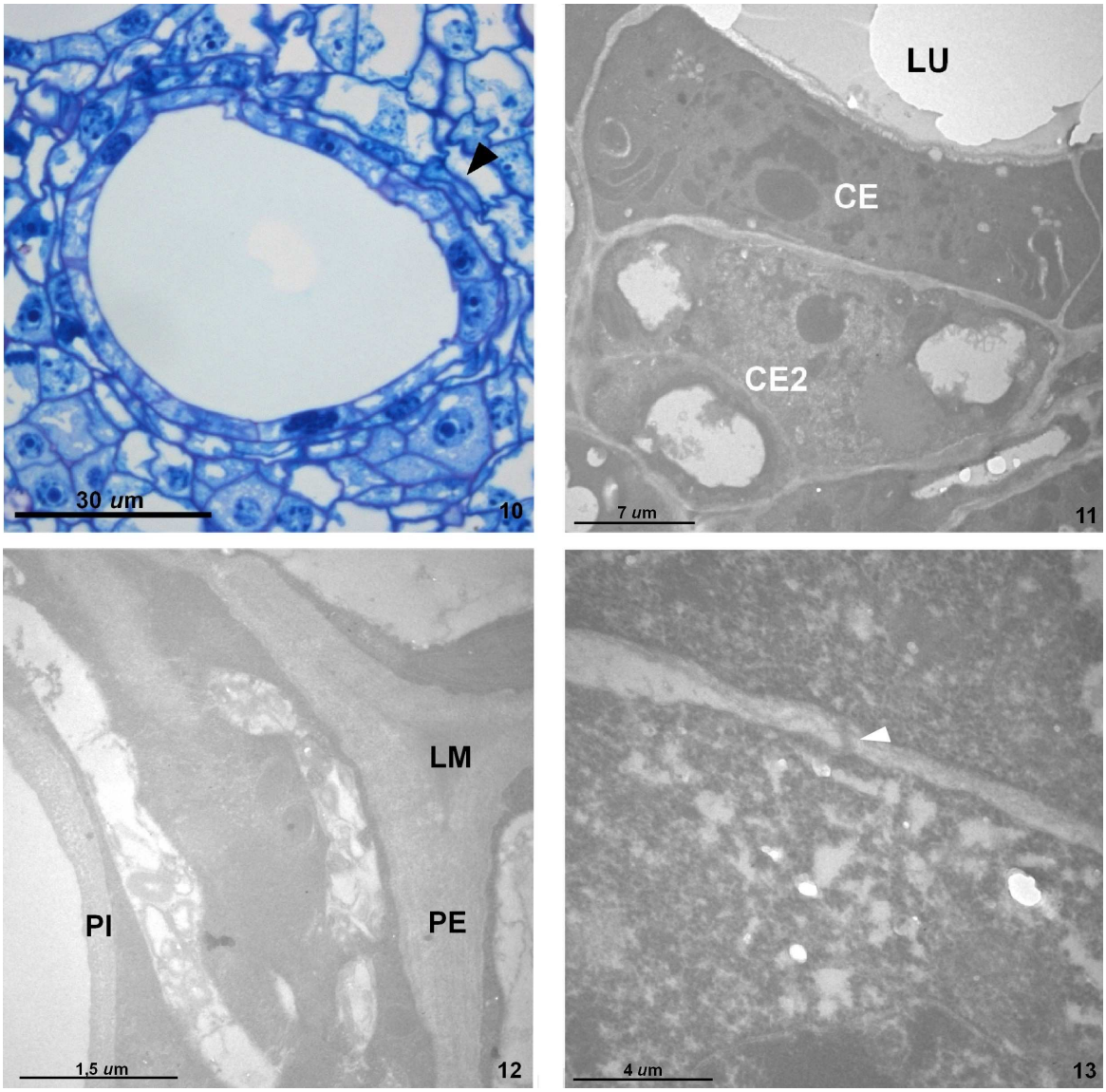
ILUSTRAÇÕES



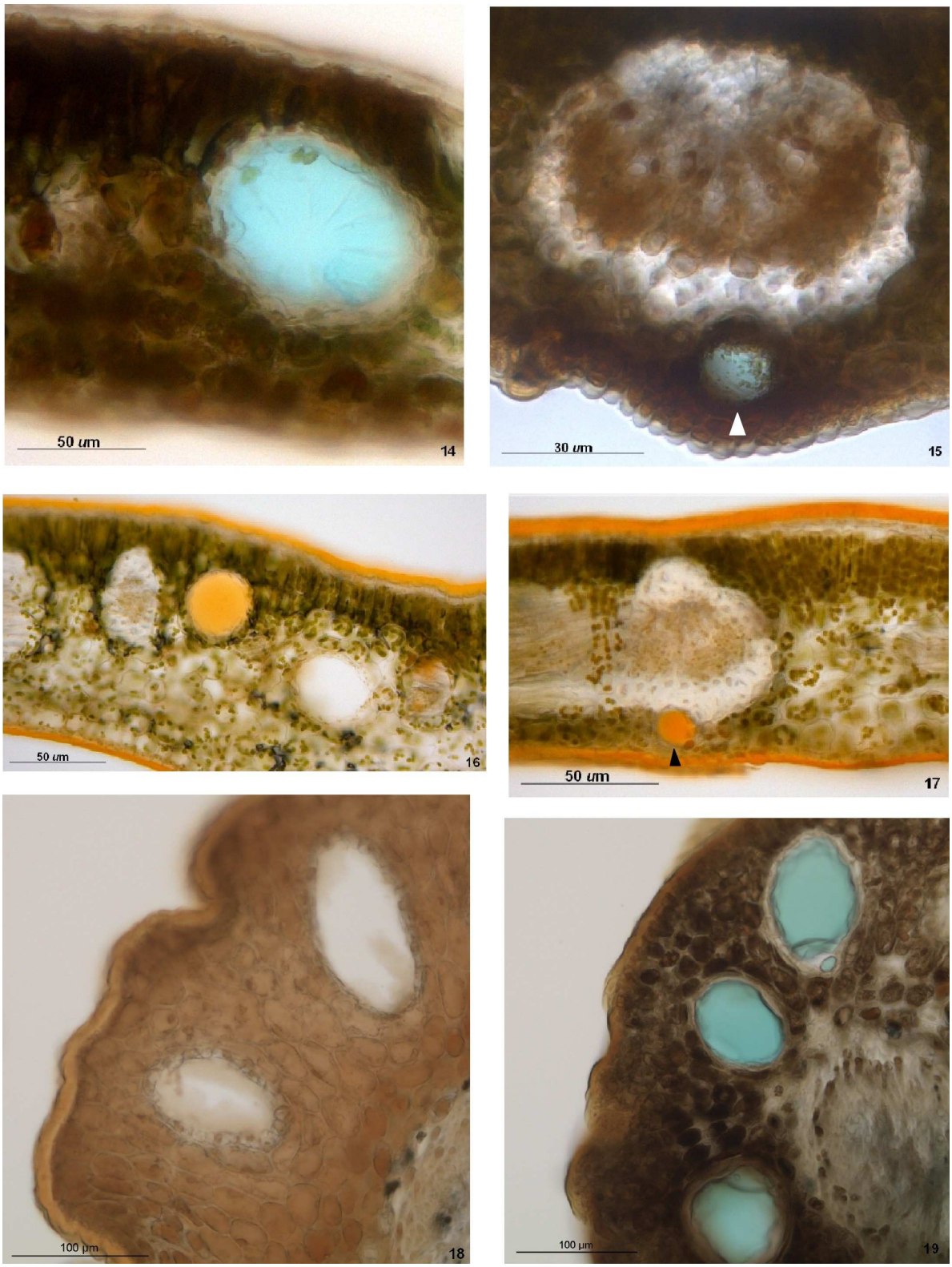
Figuras 2-4. Localização e forma das cavidades secretoras (setas) na lâmina foliar diafanizada de *Copaifera trapezifolia*. 2. Aréola no ápice da folha. 3. Aréola próxima à margem foliar. 4. Aréola na região mediana.



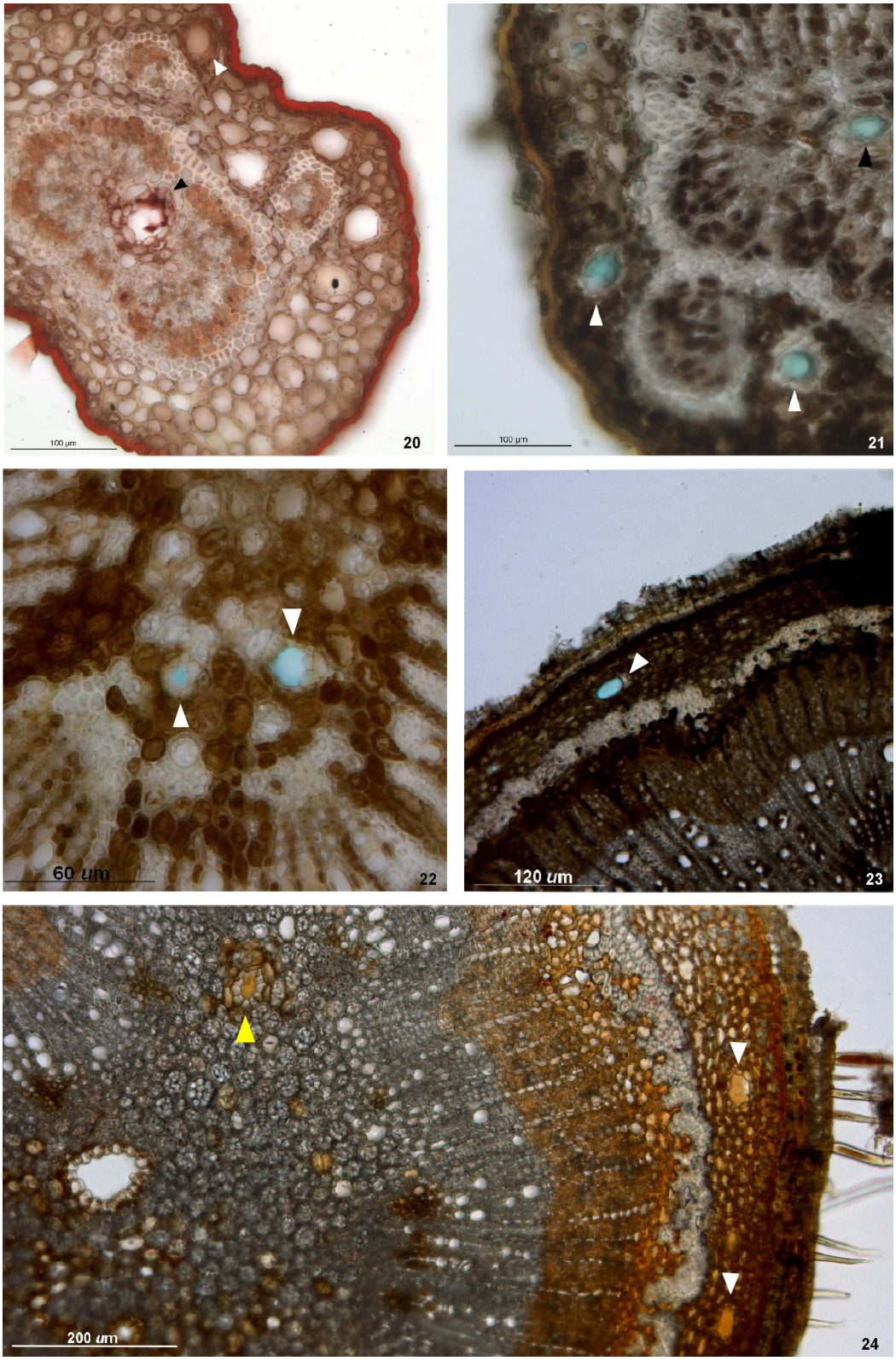
Figuras 5-9. Localização das cavidades secretoras na lâmina foliar, no pecíolo e no caule em estrutura primária e secundária seccionados de *Copaifera trapezifolia*. 5. Cavidade secretora no mesofilo, entre parênquimas paliçádico e lacunoso. 6. Cavidade secretora na face abaxial da nervura central (seta). 7. Cavidades secretoras no córtex do pecíolo. 8. Cavidades secretoras no córtex (seta amarela) e na medula (setas pretas) do caule em estrutura primária. 9. Cavidades secretoras na medula (setas brancas) e no córtex (seta amarela) do caule em início de estrutura secundária.



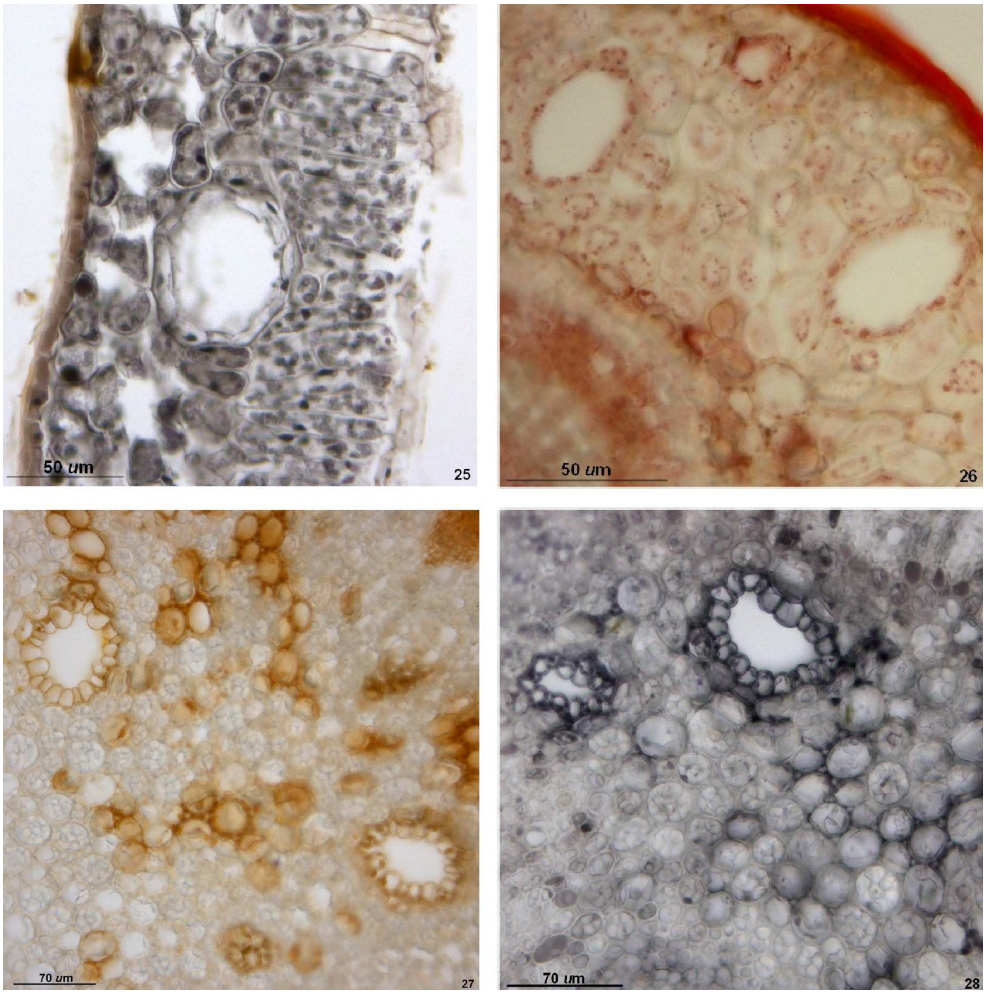
Figuras 10-13. Cavidades secretoras adultas em gemas axilares seccionadas de *Copaifera trapezifolia.* 10. Fotomicrografia da cavidade secretora foliar com epitélio bisseriado (seta). 11. Eletromicrografia de duas células do epitélio bisseriado em detalhe. LU: Lúmen; CE: Célula epitelial; CE2: Célula epitelial da segunda camada. 12. Eletromicrografia de uma célula epitelial ilustrando a diferença em espessura entre a parede celular interna (PI) e a externa (PE). LM: Lamela média; LU: Lúmen. 13. Eletromicrografia de paredes celulares de células epiteliais vizinhas mostrando um plasmodesmo (seta).



Figuras 14-19. Conteúdo secretor das cavidades secretoras da lâmina foliar (14-17) e do pecíolo (18-19) de *Copaifera trapezifolia*. 14, 15, 19. Conteúdo resinoso evidenciado por reação com acetato cúprico em cavidades no mesofilo (14), na nervura central (seta, 15) e no peciolo (19). 16, 17, 18. Conteúdo lipofílico evidenciado por reação com sudam III em cavidades no mesofilo (16), na nervura central (seta, 17) e no peciolo (18).



Figuras 20-24. Conteúdo secretor das cavidades secretoras no córtex e na medula do caule em estrutura primária (20-21) e em início de estrutura secundária (22-24) de *Copaifera trapezifolia*. 20, 24. Conteúdo lipofílico evidenciado por reação com sudam III em cavidades na medula (seta preta, 20) e no córtex em estrutura primária (seta branca, 20), e na medula (setas brancas, 24) e no córtex (seta amarela, 24) do caule em início de estrutura secundária. 21, 22, 23. Conteúdo resinoso evidenciado por reação com acetato cúprico em cavidades na medula (seta preta, 21) e no córtex (setas brancas, 21) do caule em estrutura primária, e no córtex (22) e na medula (23) do caule em estrutura secundária.



Figuras 25-28. Conteúdo das células epiteliais das cavidades secretoras foliares (25-26) e caulinares (27-28) de *Copaifera trapezifolia*. 25. Lâmina foliar. Células epiteliais com compostos fenólicos (reação com formalina em sulfato ferroso). 26. Pecíolo. Células epiteliais com substâncias lipofílicas (reação com sudam III). 27. Medula do caule em início de estrutura secundária. Células epiteliais com substâncias lipofílicas (reação com sudam III). 28. Medula do caule em início de estrutura secundária. Células epiteliais com compostos fenólicos (reação com formalina em sulfato ferroso).

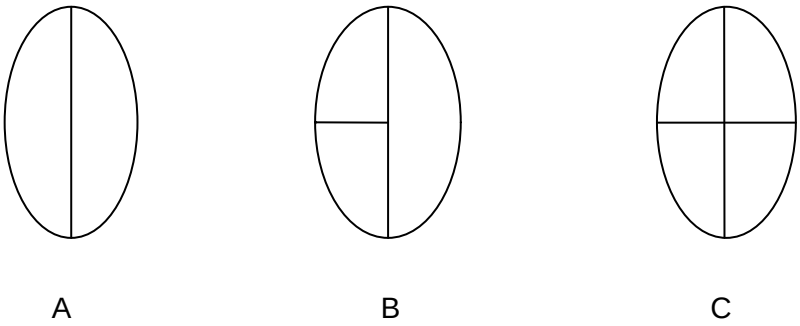
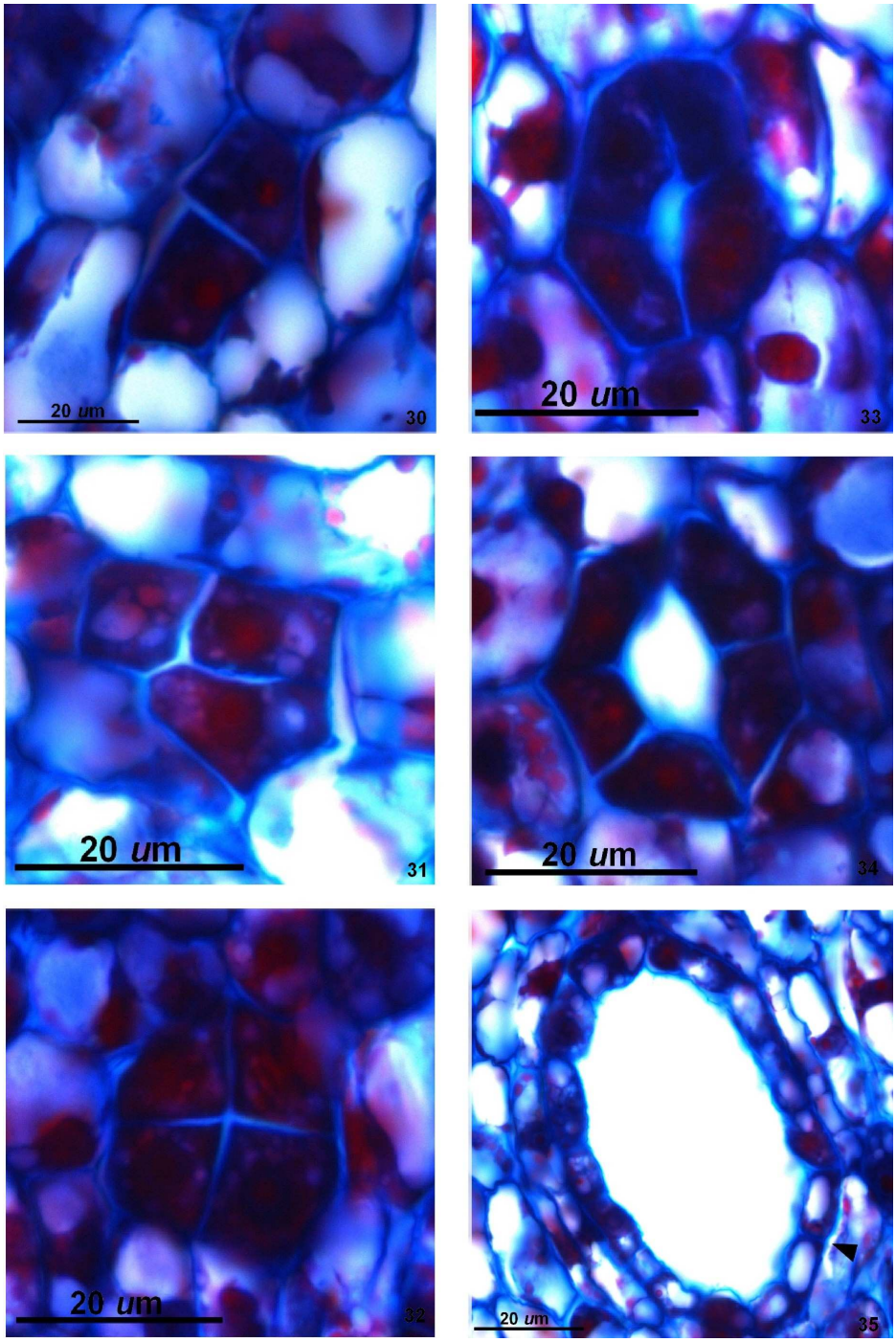
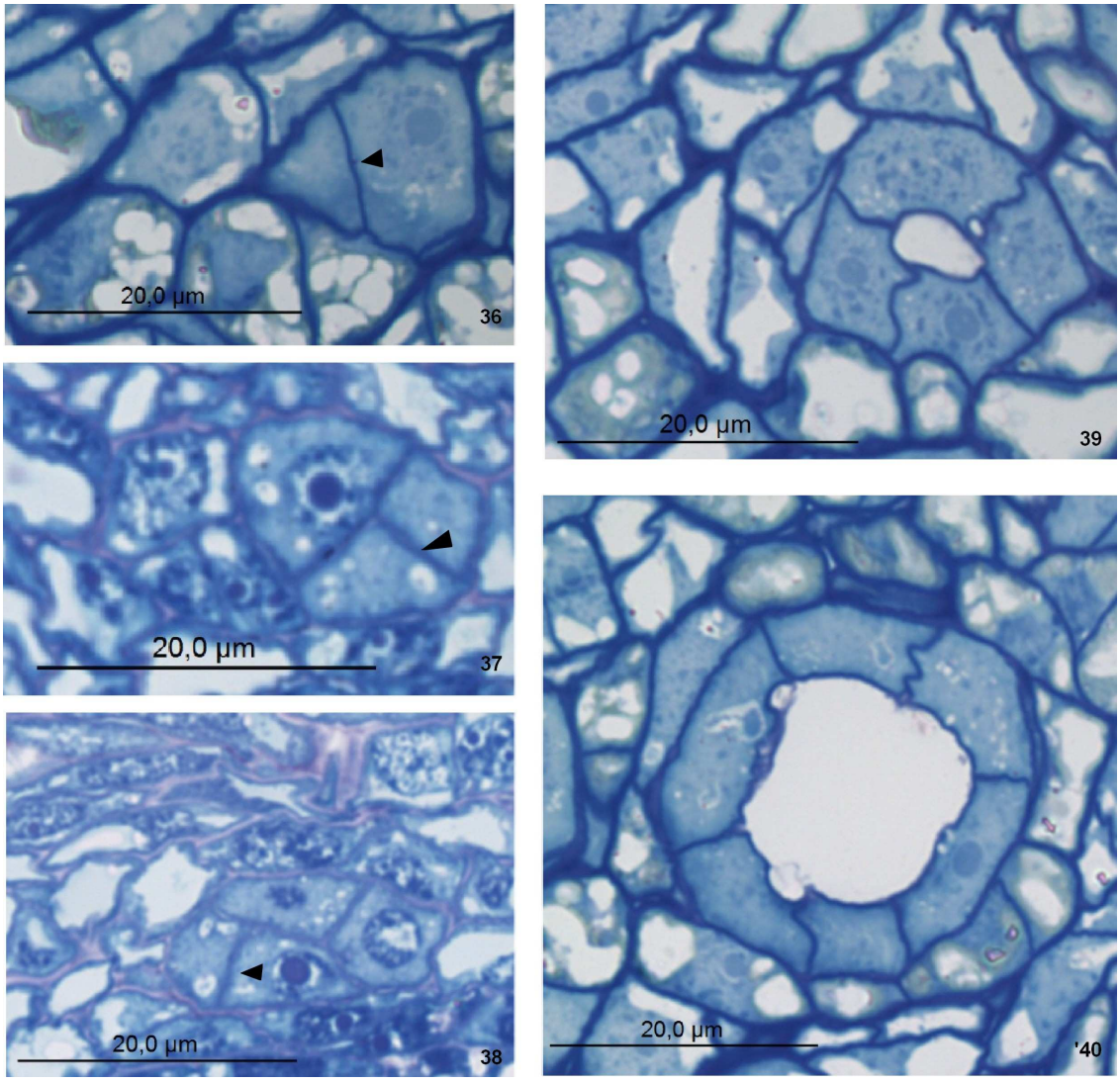


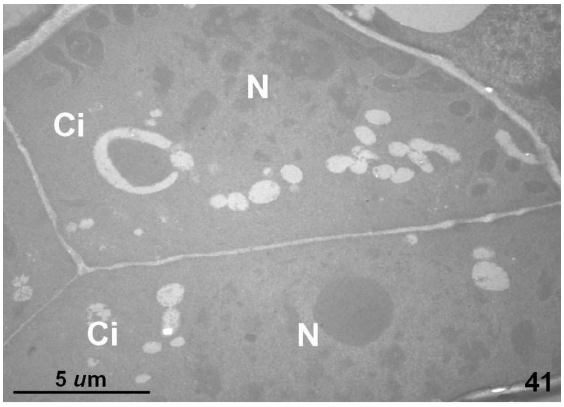
Figura 29. Desenho esquemático dos planos de divisão das células do meristema fundamental que originam as cavidades secretoras de *Copaifera trapezifolia*. A. 1ª divisão celular (periclinal). B. 2ª divisão celular (anticlinal). C. 3ª divisão celular (anticlinal).

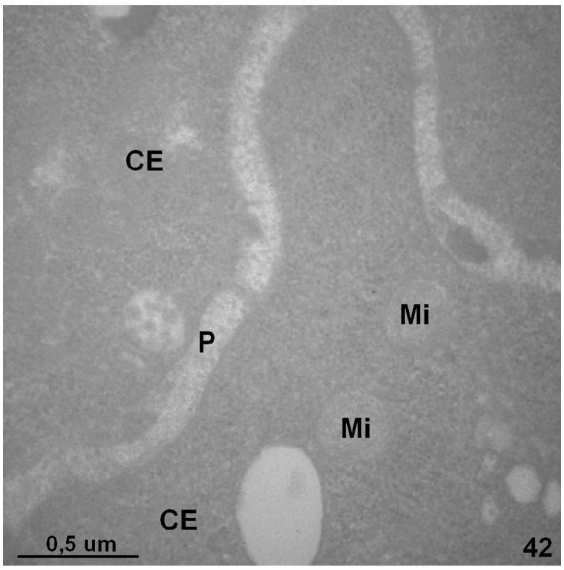


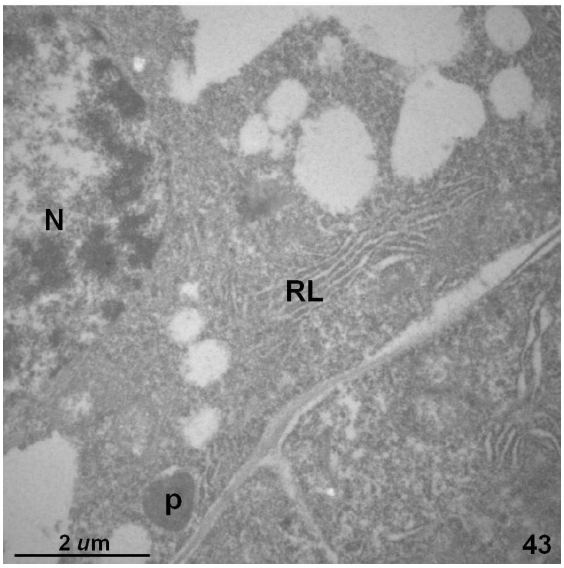
Figuras 30-35. Ontogenia das cavidades secretoras foliares de *Copaifera trapezifolia* (seccionamento transversal). 30. Primeira divisão periclinal da célula do meristema fundamental originando duas células. 31. Segunda divisão celular anticlinal originando três células. 32. Terceira divisão celular anticlinal originando quatro células. 33. Início da formação do lúmen por esquizogenia. 34. Cavidade adulta com lúmen formado. 35. Cavidade adulta com células epiteliais de conteúdo denso e outras vacuoladas (seta).



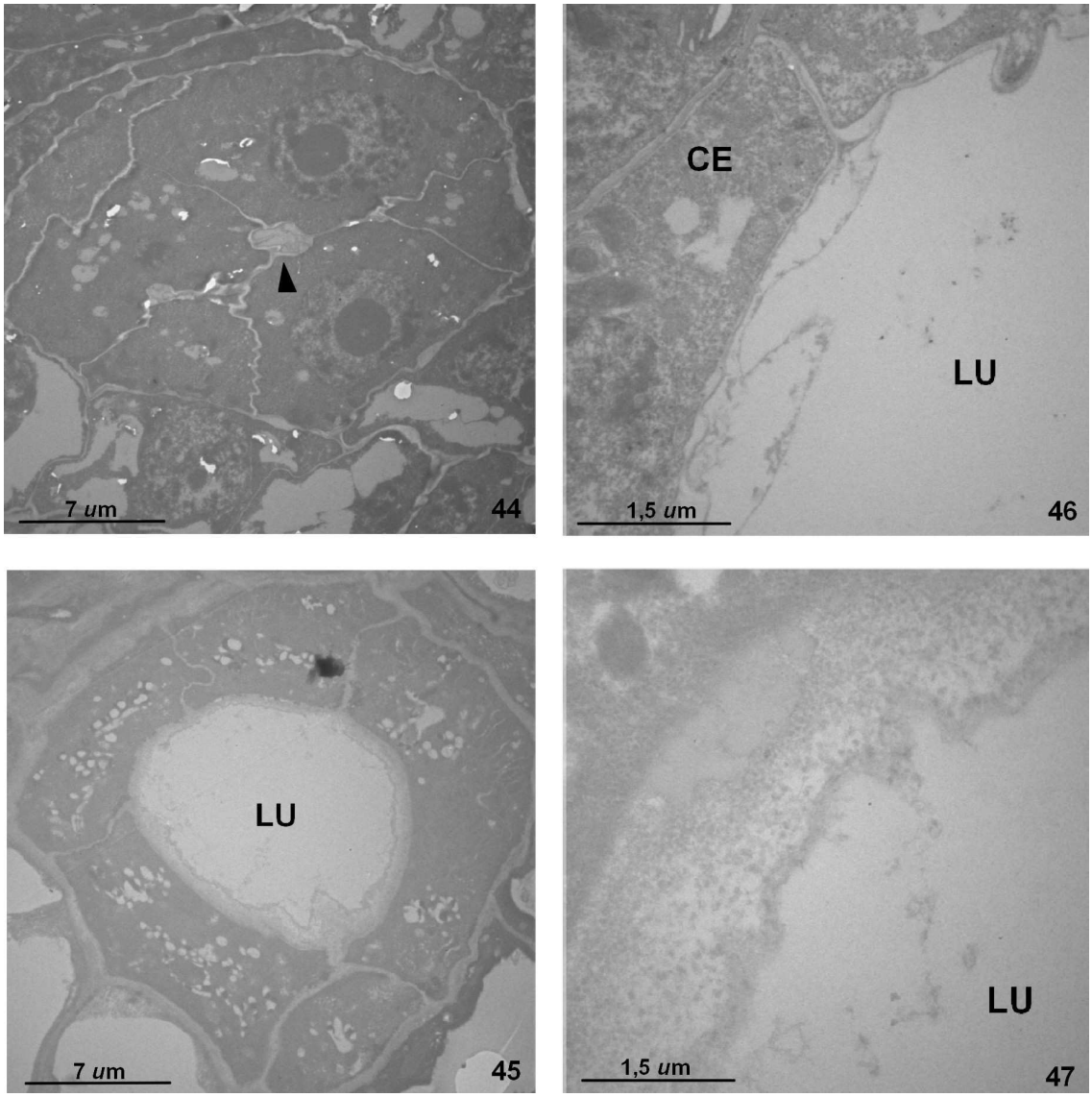
Figuras 36-40. Ontogenia das cavidades secretoras caulinares de *Copaifera trapezifolia* (seccionamento transversal). 36. Primeira divisão celular periclinal (seta) originando duas células 37. Segunda divisão celular anticlinal (seta) originando três células. 38. Terceira divisão celular anticlinal (seta) originando quatro células. 39. Início da formação do lúmen por esquizogenia. 40. Cavidade adulta com lúmen formado.



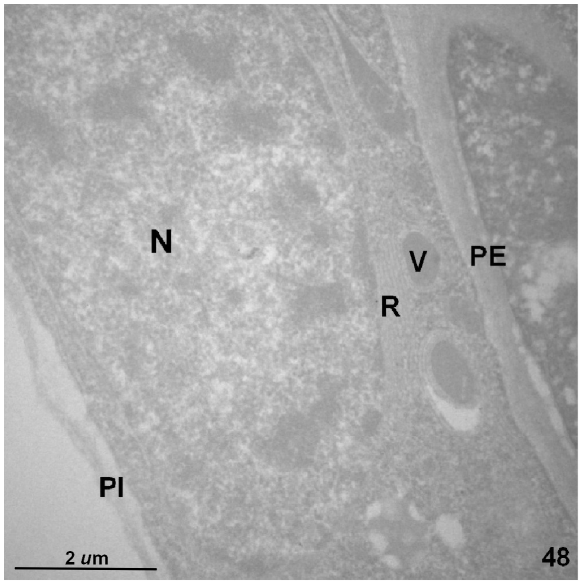


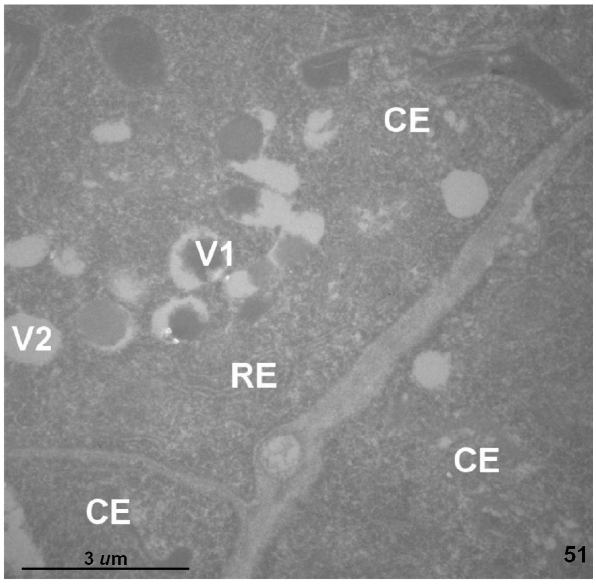


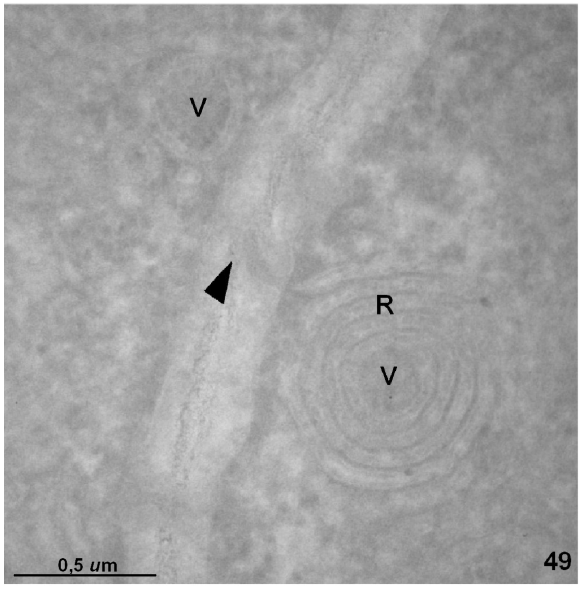
Figuras 41-43. Eletromicrografias (MET) das cavidades secretoras caulinares (41-42) e foliares (43) de *Copaifera trapezifolia* antes da formação do lúmen. 41. Duas células epiteliais evidenciando núcleo central (N) e citoplasma denso (Ci). 42. Detalhe do citoplasma e da parede anticlinal (P) de duas células epiteliais (CE) vizinhas. Observe as mitocôndrias (Mi) próximas à parede anticlinal. 43. Detalhe da célula epitelial, mostrando núcleo (N) com cromatina esparsa, retículo endoplasmático liso (RL) e plastídeo (p).

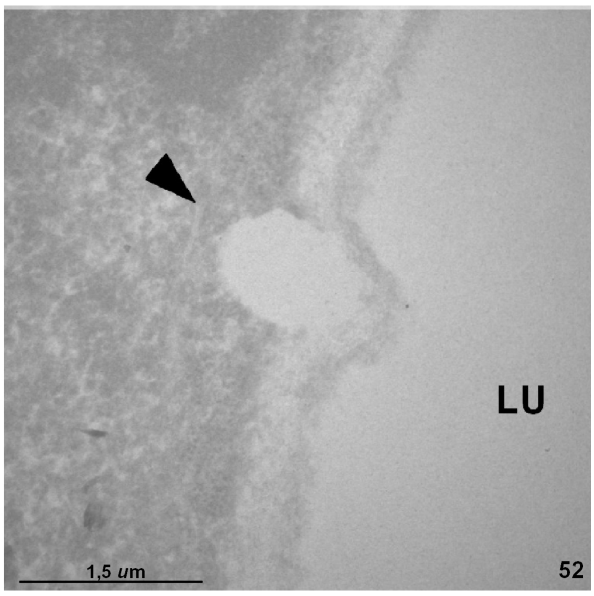


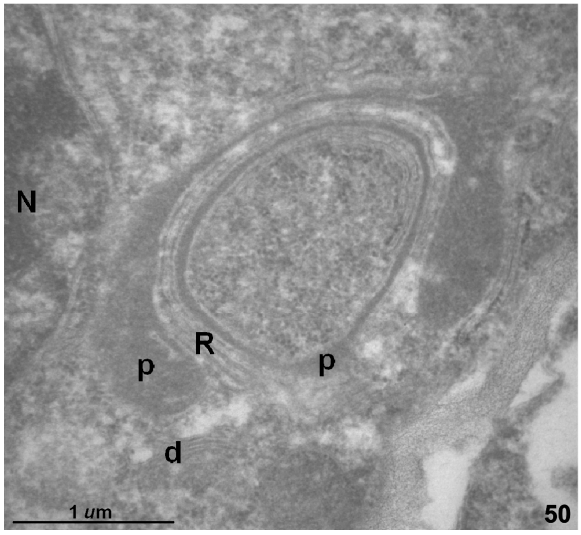
Figuras 44-47. Eletromicrografias (MET) das cavidades secretoras caulinares de *Copaifera trapezifolia* em vários estádios de desenvolvimento. 44. Início da formação do lúmen (seta). 45. Cavidade adulta com lúmen formado (LU). 46. Célula epitelial (CE) e degradação da lamela média. 47. Detalhe da parede celular interna que delimita o lúmen (LU) evidenciando restos da lamela média.

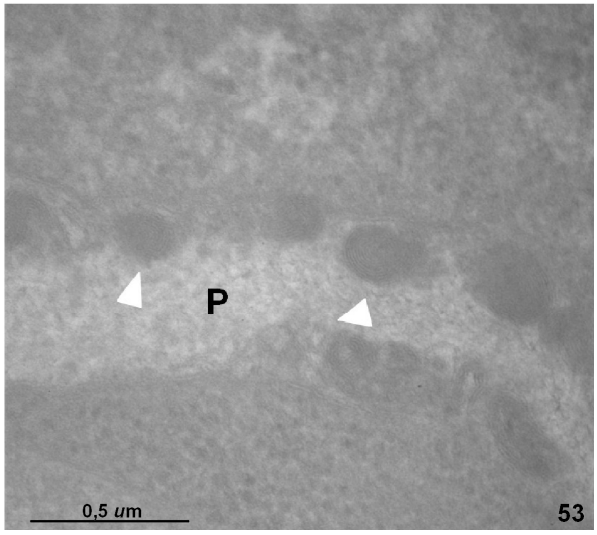

N
V
PE
R
Pl
2 um
48


CE
V1
V2
RE
CE
CE
3 um
51


V
R
V
0,5 um
49


LU
1,5 um
52


N
R
p
p
d
1 um
50


P
0,5 um
53

Figuras 48-53. Eletromicrografias (MET) das células epiteliais de cavidades secretoras foliares (48-50, 52) e caulinares (51, 53) de *Copaifera trapezifolia*, durante a produção (48-50) e liberação (51-53) da óleo-resina. 48. Célula epitelial polarizada: citoplasma próximo à parede periclinal externa (PE) e núcleo (N) próximo a parede periclinal interna (PI). LU – lúmen. Observe a associação do retículo endoplasmático liso (R) a uma vesícula (V). 49. Detalhe das vesículas (V) associadas ao retículo (R), e de um plasmodesma (seta) com um desmotúbulo. 50. Detalhe da associação de dois plastídeos (p) e retículo endoplasmático liso (R). N – Núcleo; d – Dictiossomo. 51. Citoplasma de três células epiteliais (CE) mostrando a fusão de vesículas com conteúdos distintos (elétron-denso - V1 e elétron-opaco - V2). RE - retículo endoplasmático rugoso; PI - parede periclinal interna. 52. Detalhe da parede periclinal interna mostrando a liberação de uma vesícula (seta) para o lúmen (LU). 53. Transporte de vesículas (setas) por entre as microfibrilas de celulose das paredes (P) anticlinais de duas células epiteliais.

5. DISCUSSÃO

Representantes de *Copaifera trapezifolia* exibem cavidades secretoras na folha e no caule em estrutura primária e em início de estrutura secundária, diferindo dos registros da literatura para outras espécies do gênero, nas quais foram observados canais secretores por VEIGA Jr.; PINTO (2002) e canais e cavidades secretores por RODRIGUES (2008). Cabe ressaltar que *C. langsdorffi* exibe canais secretores entremeando os raios parenquimáticos do lenho, originadas de diferenciação de células do câmbio vascular (RODRIGUES, 2008). Trabalhos futuros, envolvendo anatomia do lenho de *C. trapezifolia*, serão necessários para preencher esta lacuna do conhecimento.

Embora Fahn (1979) tenha conceituado canais como estruturas alongadas que demilitam um lúmen estreito, e cavidades como estruturas com lúmen esférico ou oval em secções longitudinais, não há um consenso sobre a nomenclatura deste tipo de estrutura secretora em trabalhos recentemente publicados. A distinção entre canais e cavidades não é bem clara e uma condição intermediária, isto é, uma estrutura com lúmen apresentando formato entre esférico (como em cavidades) e alongado (como nos canais secretores) foi registrada para *Porophyllum lanceolatum* - Asteraceae (MONTEIRO et al., 1995) e para *Myrocarpus*, *Myroxylon* e *Myrospermum* – Leguminosae (SARTORI; TOZZI, 2002). Estes autores utilizaram o termo reservatório secretor para tais estruturas. Veiga Jr; Pinto (2002), em sua revisão sobre os aspectos gerais do gênero *Copaifera*, adotaram o termo canal secretor, talvez abrangendo as cavidades e, provavelmente, por desconhecimento da nomenclatura adotada por Fahn (1979).

A dificuldade em se adotar uma terminologia adequada para caracteres com valor taxonômico, como é o caso das estruturas secretoras (LERSTEN; CURTIS, 1996; TEIXEIRA et al., 2000; TEIXEIRA; ROCHA, 2009), pode gerar problemas na interpretação das relações entre os grupos e da evolução de caracteres. A presença de cavidades secretoras, por exemplo, é considerada sinapomorfia para Rutaceae (GROPPO et al., 2008). Uma interpretação confiável de estruturas, tais como, canais, cavidades e reservatórios secretores e, mesmo, laticíferos e idioblastos secretores deve ser feita a partir de diafanização de peças inteiras e seccionamento longitudinal, métodos empregados neste trabalho e que permitem o reconhecimento da estrutura secretora de acordo com sua morfologia em vista frontal. Tais métodos também foram utilizados com esta finalidade em estudos de espécies de *Dahlstedtia* (Leguminosae) por Teixeira; Gabrielli (2000), em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae) por Fonseca et al. (2006) e em *Copaifera langsdorffii* por Rodrigues (2008).

A morfologia, a origem e as etapas de desenvolvimento das cavidades secretoras de *Copaifera trapezifolia* são semelhantes ao descrito na literatura para outros gêneros de Leguminosae, como: *Caesalpinia* sensu Bentham (LERSTEN; CURTIS, 1994; 1996); *Dahlstedtia* (TEIXEIRA; ROCHA, 2009); *Lonchocarpus* (TEIXEIRA et al., 2000); *Myrocarpus, Myroxylon e Myrospermun* (SARTORI; TOZZI, 2002), e também para outras famílias como Anacardiaceae (JOEL; FAHN, 1980a), Asteraceae (LERSTEN; CURTIS, 1986) e Rubiaceae (VIEIRA et al., 2001).

Por outro lado, cavidades secretoras com epitélio bisseriado foram observadas na folha e no caule de *Copaifera trapezifolia* (presente trabalho) e

de *C. langsdorffii* (RODRIGUES, 2008), embora raramente, o que constitui um dado inédito para Leguminosae. Além disto, a origem da segunda camada do epitélio em *Copaifera* difere entre as duas espécies estudadas. Em *C. langsdorffii* a segunda camada do epitélio é formada por desdiferenciação de células parenquimáticas próximas à cavidade secretora (RODRIGUES, 2008), enquanto que em *C. trapezifolia* esta camada se origina de divisões das próprias células epiteliais (presente trabalho).

Epitélio multisseriado já havia sido relatado em canais de *Mangifera indica* (JOEL; FAHN, 1980a) e *Schinus terebinthifolius* (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2001), espécies de Anacardiaceae; e em cavidades de *Porophyllum lanceolatum* - Asteraceae (MONTEIRO et al., 1995). Em *Schinus terebinthifolius* e *Porophyllum lanceolatum*, o epitélio multisseriado é também denominado bainha. Interessante notar que a origem do epitélio multisseriado dos canais de *Mangifera indica* (JOEL; FAHN, 1980a) e *Schinus terebinthifolius* (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2001) é parenquimática, ou seja, células parenquimáticas próximas se desdiferenciam para substituir aquelas células epiteliais que já produziram e liberaram a secreção. Já o epitélio multisseriado das cavidades de *Porophyllum lanceolatum* (MONTEIRO et al., 1995) resulta de divisões de células do próprio epitélio.

É provável que o epitélio bisseriado de *Mangifera indica* (JOEL; FAHN, 1980a), *Porophyllum lanceolatum* (MONTEIRO et al., 1995), *Schinus terebinthifolius* (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2001), *Copaifera langsdorffii* (RODRIGUES, 2008) e *C. trapezifolia* seja produzido para repor as células epiteliais que já liberaram a secreção. Tal fato pode explicar a presença de células epiteliais em diferentes estádios de desenvolvimento observadas

nas cavidades secretoras maduras de *C. trapezifolia* no presente trabalho. De acordo com Rodrigues (2008), as células epiteliais das cavidades secretoras de *C. langsdorffii*, após secretarem, sofrem fragmentação do protopasto, sendo liberadas no lúmen, indicando secreção do tipo holócrina, segundo conceito de Fahn (1979).

A formação do lúmen é um processo que gera muitas controvérsias na literatura. Em *Copaifera trapezifolia* foi observada a separação das células epiteliais no início do desenvolvimento para a formação do lúmen, isto é, ocorreu esquizogenia. Tal fato foi confirmado pelas análises ultraestruturais, que mostraram que não há degradação das células epiteliais, apenas a dissolução da lamela média. O processo esquizógeno é comumente relatado em Leguminosae (TURNER, 1986; MARCATI et al., 2001; TEIXEIRA; ROCHA, 2009). Porém, casos de lisogenia também são descritos na família, em espécies de *Hymenaea* (PAIVA; MACHADO, 2007) e *Pterodon* (PAIVA et al., 2008). Turner (1999) cita que artefatos decorrentes da fixação do material a ser estudado podem ser interpretados erroneamente como lise celular, e recomenda observações cautelosas no estudo do desenvolvimento de canais e cavidades secretores. Em seu trabalho com *C. langsdorffii*, Rodrigues (2008) relata processo esquizogênico para a formação da cavidade secretora após observações em microscopia de luz. Entretanto, após analisar amostras ao microscópio eletrônico de trasmissão, observou que a expansão do lúmen das cavidades e dos canais ocorre por sobreposição de processos esquizogênico e lisogênico, este último confirmado pelo teste imunocitoquímico - TUNEL, que indicou morte celular programada das células epiteliais.

O conteúdo encontrado no lúmen das cavidades secretoras foliares de *Copaifera trapezifolia* é semelhante ao das caulinares, sendo misto – oleoso e resinoso, confirmando os trabalhos de Veiga Jr; Pinto (2002) e Rodrigues (2008) para outras espécies do gênero. A localização de compostos fenólicos e lipofílicos nas células epiteliais de *C. trapezifolia* e de *C. langsdorffii* (RODRIGUES, 2008) merece destaque. Estudos químicos recentes utilizando a folha de *C. langsdorffii* detectaram flavonóides com atividade de desestruturação de cálculos renais em camundongos (BASTOS; informação verbal)[1]. Estas substâncias devem corresponder aos compostos fenólicos detectados nos canais e nas cavidades secretores por reagentes específicos, mostrando que muitas das substâncias utilizadas na produção de fitofármacos são produzidas, armazenadas e liberadas em estruturas especializadas no corpo do vegetal.

Uma mesma estrutura secretora pode produzir e secretar substâncias diferentes (JOEL; FAHN, 1980c; RODRIGUES, 2008), como seria o caso da óleo-resina e dos flavonóides em espécies de *Copaifera*. Em *Copaifera langsdorffii*, Rodrigues (2008) observou secreção mista (óleo-resina) no caule, mas não na folha. Daí a importância de identificar e comparar a natureza da secreção nos diferentes órgãos.

Com base nessas informações, o estudo comparativo da produção, do armazenamento e da secreção da óleo-resina em cada órgão torna-se essencial para evitar a extração predatória das substâncias de interesse farmacêutico no caule, uma vez que principalmente as espécies amazônicas são muito utilizadas para fins comerciais (VEIGA Jr. et al., 2001). MAY;

[1] Informação fornecida por Jairo Kenupp Bastos em Ribeirão Preto – SP, em 2009.

BARATA (2004) compararam a composição química do óleo do caule e da folha produzido por *Aniba rosaeodora* (Lauraceae), verificando que há semelhanças. Estes autores ressaltaram a importância de programas de sustentabilidade na exploração de substâncias de interesse econômico e de estudos que testem os produtos desenvolvidos a partir do óleo da folha e/ou do caule jovem para não prejudicar a árvore.

A associação de estudos químicos e morfológicos de estruturas secretoras é essencial para a ampliação do conhecimento sobre a biologia da secreção. Tais estudos são raramente encontrados na literatura, podendo ser citados os de Ferro et al. (2007), que avaliaram a natureza química da secreção de tricomas de *Vernonia platensis* (Asteraceae); de Furr; Mahlberg (1981), que verificaram a composição química dos tricomas secretores e laticíferos de *Cannabis sativa* (Cannabaceae); de Martins et al. (2009), que analisaram as características anatômicas, químicas e a atividade antibacteriana dos tricomas presentes nas folhas de *Brunfelsia uniflora*, e de Vieira et al. (2001) que estudou a anatomia e composição química das cavidades secretoras foliares de *Rustia formosa* (Rubiaceae).

Como a composição da secreção das estruturas secretoras observadas nas copaíbas é conhecida, o estudo ultraestrutural associado à histolocalização da óleo-resina nas cavidades secretoras de *Copaifera trapezifolia* permite inferir que: (1) o constituinte resinoso da secreção deve ser produzido nos retículos endoplasmáticos e plastídeos, e transportado pelas vesículas produzidas por essas organelas, como relatado para *Pinus halepensis* (BENAYOUN; FAHN, 1979), *Mangifera indica* (JOEL; FAHN, 1980b), *Pterodon emarginatus* (PAIVA et al., 2008) e *Copaifera langsdorffii*

(RODRIGUES, 2008); (2) o constituinte oleoso deve ser produzido nos retículos endoplasmáticos lisos abundantes e hipertrofiados, como descrito para *Porophyllum lanceolatum* (MONTEIRO et al., 1999), *Copaifera langsdorffii* (RODRIGUES, 2008), *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata* (TEIXEIRA; ROCHA, 2009); Fahn (1979; 1988) e Staehelin (1997) também fizeram esta associação anteriormente; (3) o constituinte fenólico deve ser produzido nos retículos endoplasmáticos rugosos abundante nas células, semelhante ao observado em *Pseudotsuga menziensii* e *Pinus taeda* (gimnospermas) por Parham; Kaustinen (1977); (4) a produção das diferentes substâncias deve ser individualizada, já que foram observadas vesículas com conteúdos distintos, associadas a organelas distintas, assim como em *Anacardium occidentale* – Anacardiaceae (NAIR et al., 1983) e em *Trimezia fosteriana* – Iridaceae (BYSTEDT; VENNIGERHOLZ, 1991).

A liberação do conteúdo secretor das cavidades e canais em espécies de Leguminosae não é uma condição conservada no grupo. O processo secretor das cavidades secretoras de *Copaifera trapezifolia* pode ser classificado como granulócrino, ou seja, as substâncias contidas em vesículas são liberadas por invaginação da plasmalema, ocorrendo fusão de membranas (segundo conceito de FAHN, 1979). Já em *Copaifera langsdorffi*, a secreção foi considerada holócrina (RODRIGUES, 2008), ou seja, ocorre desintegração das células para liberação da secreção (FAHN, 1979); e em *Pterodon pubescens* (Leguminosae, Papilionoideae), o processo de secreção foi descrito como écrino (RODRIGUES, 2008). Neste último caso, a secreção é eliminada do citoplasma diretamente como resultado de um gradiente de concentração ou por processo ativo (FAHN, 1979).

Neste trabalho, foram observadas muitas mitocôndrias nas células meristemáticas que originaram as epiteliais, e nas epiteliais em todas as fases de desenvolvimento das cavidades secretoras. Esta organela é comumente encontrada em células com alta atividade metabólica, responsáveis por processos que requerem muita energia, como a divisão celular (GUNNING; STEER, 1996), e a síntese e secreção de compostos (FAHN, 1988; RODRIGUES, 2008; TEIXEIRA; ROCHA, 2009). É provável que a polarização observada na célula secretora de *Copaifera trapezifolia*, com núcleo próximo ao sítio onde será liberada a óleo-resina, também esteja relacionada às necessidades energéticas da célula no momento da secreção. Esta polarização marcante também foi observada nas cavidades secretoras de resina em frutos de *Hymenaea stigonocarpa* (PAIVA et al., 2004).

Caracteres provenientes da distribuição, da morfologia e do desenvolvimento de cavidades secretoras já foram utilizados por outros autores na delimitação taxonômica de grupos em Leguminosae. Turner (1986) em seu trabalho com as tribos Amorpheae e Psoraleeae relata que o desenvolvimento e a morfologia das cavidades são distintos. Tais informações foram utilizadas para separar as duas tribos que anteriormente eram consideradas próximas devido à sua morfologia externa. Distribuição e ocorrência de cavidades secretoras também diferiram entre espécies de um mesmo gênero e entre órgãos de uma mesma espécie em *Caesapinia* sensu lato (LERSTEN; CURTIS, 1996), *Dahlstedtia* (TEIXEIRA; GABRIELLI, 2000; TEIXEIRA; ROCHA, 2009) e *Lonchocarpus* (TEIXEIRA et al., 2000).

O gênero *Copaifera* apresenta muitos problemas na circunscrição de suas espécies, sendo relatadas várias morfoespécies. Não se pode ainda concluir

sobre o valor taxonômico dos dados levantados neste trabalho para *C. trapezifolia* e no trabalho de RODRIGUES (2008) *para C. langsdorffii*, devido ao pequeno número de espécies estudado no gênero. No entanto, alguns caracteres, como tipo de estrutura secretora, origem do epitélio bisseriado e presença de óleo e resina nos órgãos aéreos vegetativos (ver tabela 2) podem auxiliar na diagnose das espécies. A inclusão de um maior número de espécies e de pesquisadores nos estudos de estruturas secretoras de *Copaifera* certamente permitirá listar novos caracteres de valor diagnóstico, úteis para a delimitação infragenérica do grupo.

Tabela 2. Caracteres relacionados às estruturas secretoras que apresentam valor diagnóstico para *Copaifera langsdorffii* e *C. trapezifolia*.

Espécie	Tipo de estrutura secretora	Ocorrência da óleo-resina	Origem do epitélio bisseriado	Referência
C. langsdorffii	canais e cavidades secretores	caule	células parenquimáticas adjacentes	RODRIGUES, 2008
C. trapezifolia	cavidades secretoras	caule e folha	células do próprio epitélio	presente trabalho

Estruturas secretoras apresentam papel ecológico importante, uma vez que as substâncias armazenadas e/ou secretadas podem proteger a planta contra herbívoros e patógenos, e atrair animais patrulheiros, polinizadores e dispersores (FAHN, 1979). O papel de proteção da planta contra herbivoria foi atribuído às cavidades secretoras em espécies de *Copaifera* (VEIGA Jr; PINTO, 2002; RODRIGUES, 2008). Rodrigues (2008) relata ainda a

importância da secreção contida nos canais e cavidades secretores de *C. langsdorffii* contra desidratação, condição adversa comumente encontrada no Cerrado. Apesar do importante papel ecológico atribuído à secreção contida nas estruturas secretoras, estudos sobre as funções exercidas por estas estruturas nas plantas carecem de suporte experimental (FARREL et al. 1991; LANGENHEIM, 2003).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho detalhou um tipo de estrutura secretora em uma espécie no vasto contingente de representantes de Leguminosae. *Copaifera trapezifolia* é pouco conhecida, mas está incluída em um grupo de plantas de grande interesse econômico no Brasil.

Encontrou-se que características subcelulares, mecanismos de produção e liberação de substâncias e, mesmo, a forma das cavidades seretoras, não são constantes em um grupo taxonômico próximo e, até, em diferentes órgãos de uma espécie, como esperado por pesquisadores da área.

Comparações de estruturas secretoras no caule e na folha, em especial aquelas estruturas secretoras internas, como canais e cavidades, idioblastos e laticíferos, provêm ferramentas importantes para a conservação de espécies utilizadas para o mesmo fim, minimizando os efeitos antrópicos prejudiciais às mesmas e ao seu ecossistema.

Ainda, espera-se que os dados gerados possam, unidos a outros esforços na área, contribuir com estudos experimentais, moleculares e filogenéticos de estruturas secretoras, ainda raros na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia Central. 1 – Germinação. **Acta Amazônica**, Manaus, v.11, n. 1, p. 3-11, 1981.

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 79-82, 1982.

ALVES, G.M.; CASTRO, M.M. **Anatomia foliar de duas espécies de *Acosmium* (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae)**. Sociedade Botânica do Brasil (Resumos: p.172), 2002.

BARBOSA J.M.; AGUIAR, I.B.; SANTOS, S.R.G. Maturação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 665-674, 1992.

BENAYOUN, J.; FAHN, A. Intracellular transport and elimination of resin from epithelial duct-cells of *Pinus halepensis*. **Annals of Botany**, v. 43, n. 2, p. 179-181, 1979.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. UFV, Viçosa, v. 2, p. 15-100, 1991.

BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C. Terpenoids from *Copaifera cearensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 263-264, 1998.

BUKATSCH, F. Bermerkungen zur Doppelfärburg Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BYSTEDT, P.A.; VENNIGERHOLZ, F. The transmitting tract in *Trimezia fosteriana* (Iridaceae) II. Development of secretory cells in the stigma, style and ovary. **Nordic Journal of Botany,** v. 11, n. 3, p. 345-357, 1991.

CAMARGOS. J. A. A.; CZAMESKI, C. M.; MEGUERDITCHIAN, I.; OLIVEIRA, D. de. **Catálogo de árvores do Brasil**. Brasília: IBAMA. 1996, 887 p.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guyanensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: Apezzato-Da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M. **Anatomia Vegetal**. 2 ª ed. Editora UFV, Viçosa, 2006. 438p.

COSTA, J.A.S; QUEIROZ, L.P. *Copaifera sabulicola* (Leguminosae), uma nova espécie do Cerrado brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 393-396, 2007.

CRESTANA, C.S.M.; KAGEYAMA, P.Y. Biologia de polinização de *Copaifera langsdorffii* DESF. (Leguminosae-Caesalpinioideae), o “óleo-de-copaíba”. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 201-214, 1989.

DAVID, R.; CARDS, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyer dy reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires dês Séances de l' Academie dês Sciences Paris, Série D**, v. 258, p. 1338-1340, 1964.

EIRA M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; MELLO, C.M.C.; TANAKA, D.M. Conservação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 523-526, 1992.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução de Berta Lange de Morretes. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1974. 312p.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London, Academic Press, 1979. 302 p.

FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New phytologist**, v. 108, n. 3, p. 229-257, 1988.

FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 37-75, 2000.

FARREL, B.D.; DUSSORD, D.E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? **The American Naturalist**, v. 138, n.4, p, 881-900, 1991.

FERRO, P.R.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; HAYASHI, A.H.; ARAKAWA, N.S.; DA COSTA, FERNANDO B. **Investigação fitoquímica de *Vernonia platensis* (Asteraceae, Vernonieae) com emprego da técnica de microamostragem de tricomas glandulares e análise cromatográfica de alta eficiência.** In: 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Usp, 2007, Ribeirão Preto. Resumos, 2007

FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T., BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n. 2, p. 21-31, 2008.

FONSECA, M.C.M., MEIRA, R.M.S.A.; CASALI, V.W.D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 707-713, 2006.

GOMES, S.M.; SOMAVILLA, N.S.D.N.; GOMES-BEZERRA, K.M.; MIRANDA, S.C.; DE-CARVALHO, P.S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

GROPPO, M.; PIRANI, J.R.; SALATINO, M.L.F.; BLANCO, S.R.; KALLUNKI, J. A. Phylogeny Of Rutaceae Based On two Noncoding Regions From cpDna. **American Journal of Botany**, v. 95, n.8, p. 985–100, 2008.

GUNNING, B.E.S.; STEER, M.W. **Plant Cell Biology - Structure and Function.** Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1996, 131p.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry:** principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman e colaboradores, 1962. 408 p.

JOEL, D.M.; FAHN, A. Ultrastrucutre of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 1. Differentiation and senescence of the shoot ducts. **Annals of Botany**, n. 46, p. 225-233, 1980 a.

JOEL, D.M.; FAHN, A. Ultrastrucutre of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 2. Resin secretion in the primary stem ducts. **Annals of Botany**, n. 46, p. 779-783, 1980 b.

JOEL, D.M.; FAHN, A. Ultrastrucutre of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 3. Secretion of the Protein-polysaccharide mucilage in the fruit. **Annals of Botany**, n. 46, p. 785-790, 1980 c.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde fixative of high osmalarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology,** v. 27, p.137A-138A, 1965.

KRAUS, J.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Seropédica: EDUR, 1997. 198p.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I.S.; MACHADO, S.R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). Acta Botânica Brasílica, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2007.

LACCHIA, A.P.S.; GUERREIRO, S.M.C. **Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae** Acta Botânica Brasílica, v. 23, n.2, p. 376-388, 2009.

LANGENHEIM, J.H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany.** Timber Press, Cambridge, 2003, 586p.

LEE, Y.T.; LANGENHEIM, J.H. A systematic revision of the genus *Hymenaea* (Leguminosae; Caesalpinioideae; Detarieae). **University of California Publications in Botany**, v.69, p. 1-109, 1975.

LEITE, A.; ALECHANDRE, A.; RIGAMONTE-AZEVEDO, C.; CAMPOS, C.A.; OLIVEIRA, A. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2001. 38 p.

LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Tubular cavities in white snakerrot, *Eupatorium rugosum* (Asteaceae). **American Journal of Botany**, v. 73, n.7, p. 1016-1021, 1986.

LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. **Plant Systematics and Evolution**, v. 192, p. 231-255, 1994.

LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 200, p. 21-39, 1996.

LEWIS; G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577 p.

LIMA, H.C., Leguminosas da Flora Fluminensis – J.M. da C. Vellozo – Lista atualizada das espécies arbóreas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 9, n.1, p.123-146, 1995.

LIN, J.; SAMPSON, D.A., CEULEMANS, R. The effect of crown position and tree age on resin-canal density in scots pine (*Pinus sylvestris* l.) Needles. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 11, p.1257–1261, 2001.

LINO, C.F.; BECHARA, E. **Estratégias e Instrumentos para a Conservação, Recuperação e Desenvolvimento Sustentável na Mata Atlântica.** Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, São Paulo, 2002. 44p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**.** Nova Odessa/SP: Ed. Plantarum, 1992. 352 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MACHADO, S.R; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Estrutura e desenvolvimento de Canais Secretores e frutos de *Schinus Terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, n.2, p. 189-195, 2001.

MACHADO, S.R.; OLIVEIRA, D.M.T.; DIP, M.R.; MENEZES, N.L. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 1, p. 115-123, 2004.

MARCATI, C.R.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpioideae) de floresta e cerradão. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 311-320, 2001.

MARTINS, M.B.G.; GRAF, R.R.; CAVALHEIRO, A.J.; RODRIGUES, S.D. Caracterização anatômica, química e antibacteriana de folhas de *Brunfelsia uniflora* (manacá) presentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 106-114, 2009.

MARTINS-da-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F.; LIMA, H.C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008.

MAUSETH, J.D. Release of whole cells of *Nopalea* (Cactaceae) into secretory canals. **Botanical gazette**, v.141, n.1, p. 15-18, 1980.

MAY, P.H.; BARATA, L.E.S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. **Economic Botany**, v. 58, n. 2, p. 257–265, 2004.

MCNAIR, J. Secretory canals of *Rhus diversiloba.* **Botanical Gazette**, v. 65, p. 268-273, 1918.

MONTEIRO, W.R, GIULIETTI, A.M., MAZZONI, S.C.; CASTRO, M.M. Hairs on reproductive organs of some Eriocaulaceae and their taxonomic significance. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 7, p. 43-59, 1979.

MONTEIRO, W.R; CASTRO, M.M.; FAHN, A.; CALDEIRA, W. Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). **Nordic Journal of Botany**, n. 15, v. 1, p. 69-76, 1995.

MONTEIRO, W.R., FAHN, A., CALDEIRA, W.; CASTRO, M.M. Ultrastructural observation on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). **Flora**, v. 194, p. 113-126, 1999.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Copaiba oil: isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1013-1015, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. de; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403, p. 853-858, 2000.

NAIR, G.M.; VENKAIAH, K.; SHAH, J.J. Ultrastructure of gum-resin ducts in Cashew (Anacardiaceae occidentale). **Annals of Botany**, v. 51, n. 3, p. 297-305, 1983.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OKAMOTO, M.K.H.; KATO, E.T.M.; BACCHI, E.M. Morfoanatomia de folhas de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p.599-603, 2009.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

PAIVA, E.A.S.; MACHADO, S.R.; OLIVEIRA, D.M.T. **Aspectos estruturais e ultra-estruturais das cavidades secretoras de resina em frutos de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae).** *In:* CD-ROM do 55º Congresso Nacional de Botânica, 2004.

PAIVA, E.A.S.; OLIVEIRA, D.M.T. Ontogenesis of the fruit pulp layer of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae). **Australian Journal of Botany**, v.52, n.4, p. 677-683, 2004.

PAIVA, E.A.S.; MACHADO, S.R. Structural an ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stignocarpa* (Fabaceae- Caesalpinoideae) leaves. **Nordic Journal of Botany**, v. 24, p. 423-431, 2007.

PAIVA, E.A.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; MACHADO, S.R. Anatomy and ontogeny of the pericarpo of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae, Faboideae) with emphasis on secretory ducts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 455-465, 2008.

PARHAM, R.A; KAUSTINEN, H.M. On the Site of Tannin Synthesis in Plant Cells. **Botanical Gazette**, v. 138, n. 4, p. 465-467, 1977.

PAULA, J.A.M.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D.; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum - Myrtaceae. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v.2, n. 2, p. 153-156, 2005.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. I, p. 86-87; v. II, p. 370-375, 1984.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Evolution and systematics of the Leguminosae. p. 1-26. *In*: R.M. POLHILL; P.H. RAVEN (eds.). **Advances in Legume Systematics, part I**. Kew, Royal Botanic Gardens. 1981.

RBMA – Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. 2003. Disponível em <http://www.rbma.org.br/anuario/mata_01_sintese.asp> Acessado em 24. nov. 2008.

REYNOLDS, E.W. Use of lead citrate at high Ph as an electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

RODRIGUES, T.M. **Espaços secretores em *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Pterodon pubescens* Benth.: Ontogênese, estrutura e secreção**. Botucatu, Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. 2008

SAMPAIO, P.T.B. Copaíba. In: Clay, W.; Sampaio, P.T.; Clement, C.R. **Biodiversidade amazônica:** exemplos e estratégias de utilização, por Manaus: [INPA], p. 207-215, 2000.

SARTORI, A.L.B.; TOZZI, A.M.G.A. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L.f. and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-

Papilionoideae-Sophoreae) species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 249-259, 2006.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.

STAEHELIN. L.A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. **The Plant Journal**, v. 11, n.6, p. 1151-1165, 1997.

TEIXEIRA, S.P.; GABRIELLI, A.C. Anatomia do eixo vegetativo de *Dahlstedtia pinnata* (Benth.) Malme e *D. pentaphylla* (Taub.) Burk. (Leguminosae, Papilionoideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 1, p. 01-11, 2000.

TEIXEIRA, S.P.; CASTRO, M.M.; TOZZI, A.M.G.A. Secretory cavities and pellucid dots in leaflets of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 221, p. 61-68, 2000.

TEIXEIRA, S.P.; ROCHA, J.F. Oil glands in the Neotropical genus *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n.1, p. 33-40, 2009.

TURNER, G. Comparative development of secretory cavities in the tribes Amorpheae and Psoraleeae (Leguminosae: Papilionoideae). **American Journal of Botany**, v. 73, p.1178–1192, 1986.

TURNER, G.W.; BERRY, A.M.; GIFFORD, E.M. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, n. 1, p. 75-88, 1998.

TURNER, G.W. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. **The Botanical Review**, v. 65, n 1, p. 76-88, 1999.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Authenticity control of commercial copaiba oils by high resolution gas chromatography. **Química Nova,** v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial Copaíba oils available in Brasil. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ANDRADE JUNIOR, M.A.; FERRAZ, I.D.K.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. **Acta Amazônica**. v. 37, n.1, p. 123-126, 2007.

VIEIRA, R.C.; DELPETRE, P.G.; LEITÃO, G.G.; LEITÃO, S.G. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, n. 88, v. 12, p. 2151-2156, 2001.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 4, p. 475-478, 1958.

ZHANG, C.H.; FUJII, T.; ABE, H.; FUJIWARA, T.; FUJITA, M.; TAKABE, K. Anatomical features of radial resin canals in *Pinus densiflora.* **IAWA Journal**, v. 29, n. 2, p. 179-187, 2008.