



**Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**Morfologia, Anatomia, Histoquímica e Aspectos Fisiológicos da  
Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Botânica,  
Programa de Pós Graduação em Botânica,  
Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

**SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dalva Graciano Ribeiro**

**Brasília**

**2007**

A grayscale micrograph showing the cellular structure of a leaf lamina. The image displays a network of elongated, interconnected cells with distinct cell walls, characteristic of mesophyll tissue. The cells are arranged in a somewhat irregular, branching pattern. The overall appearance is that of a thin, porous network of plant tissue.

**Morfologia, Anatomia, Histoquímica e Aspectos Fisiológicos da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)**

**SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES**

**Morfologia, Anatomia, Histoquímica e Aspectos Fisiológicos da  
Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Botânica,  
Programa de Pós Graduação em Botânica,  
Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dalva Graciano Ribeiro**

**Brasília**

**2007**

## TERMO DE APROVAÇÃO

SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES

MORFOLOGIA, ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ASPECTOS  
FISIOLÓGICOS DA LÂMINA FOLIAR DE ESPÉCIES DE *CLUSIA*  
(CLUSIACEAE)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Botânica, Programa de Pós Graduação em Botânica, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

Profª Drª Dalva Graciano Ribeiro  
Departamento de Botânica, UnB

Prof. Dr. Augusto César Franco  
Departamento de Botânica, UnB

Profª Drª Letícia de Almeida Gonçalves  
Centro Universitário de Goiás UniANHANGÜERA

Profª Drª Sueli Maria Gomes  
Departamento de Botânica, UnB

Brasília/DF, março de 2007

## **Dedicatória**

À vida  
À minha família  
Aos meus amigos  
À persistência na realização de um sonho  
Aos pesquisadores e pesquisados

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe Adriana, pois sem seus conselhos, exemplo, amor e dedicação, este trabalho não teria sequer começado. Obrigada por seu total apoio diante de algumas decisões determinantes da minha vida e, principalmente nunca me permitir duvidar sobre minhas capacidades.

Ao meu esposo Gleyson e minha filha Luiza pelo amor e compreensão, principalmente durante o Mestrado, quando nossa vida pessoal passou por diversas vezes a segundo plano. Peço desculpas pelas inúmeras ausências.

Ao meu irmão Mateus pela cumplicidade e por me fazer rir em todos os momentos bons e difíceis da vida.

Aos meus amigos pelas conversas, distrações, sorrisos e choros. Obrigada pela paciência.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores de diversas instituições que contribuíram para minha formação educacional. Não citarei nomes para não cometer a indelicadeza de esquecer de alguém.

Aos colegas antigos e atuais da Universidade de Brasília (UnB), pelos momentos bons e difíceis que passamos juntos. Em especial ao José Geraldo Antunes de Paiva (Zé), meu querido amigo dentro e fora do laboratório, agradeço pelos ensinamentos técnicos e desabafos; e à Suzane Margaret Fank de Carvalho (Suzi), nunca esquecerei da sua boa vontade e disposição para me auxiliar nas diversas vezes que solicitei.

A todos os profissionais do Departamento de Botânica da UnB, obrigada pelo convívio, bate papo e apoio durante o desenvolvimento do Mestrado. Eli, muito obrigada por todo o auxílio técnico na preparação das incontáveis lâminas. Vando, agradeço a direção, companhia e apoio nas viagens de campo. Ao Herbário, laboratório de Fisiologia e, especialmente, ao laboratório de Anatomia agradeço a colaboração.

Obrigada ao laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB pelo apoio material e técnico, principalmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Nair Bão.

Ao Fausto, fotógrafo do Instituto de Biologia da UnB, obrigada por toda ajuda e conselhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), obrigada pela minha primeira bolsa-de-estudos, o que foi fundamental à realização deste trabalho.

À Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE) pela autorização de coleta e consultas ao Herbário. Grata a toda a equipe, em especial ao Dialis pela companhia e todo o apoio nas viagens a campo.

Ao Laboratório de Produtos Florestais do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/Brasília-DF) pela permissão do uso das instalações e equipamentos, principalmente à Dr<sup>a</sup> Vera Coradin pela orientação.

Ao Prof. Dr. Fábio Rúbio Scarano, Departamento de Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela coleta e envio das amostras, além do esclarecimento sobre as características das mesmas.

Ao Prof. MSc. Maurício Pimenta Magalhães por ter me apresentado a Anatomia Vegetal e a profissionais que foram peças chave para minha formação educacional.

Ao Prof. Dr. Augusto C. Franco (Laboratório de Fisiologia Vegetal - UnB) por ter me apresentado ao gênero que trabalho e pela orientação nas análises de fotossíntese.

Em especial, agradeço à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dalva Graciano Ribeiro (Laboratório de Anatomia Vegetal - UnB), minha orientadora desde a graduação. Muito obrigada pela oportunidade, sinceridade, apoio e amizade. Espero que esta nossa parceria perdure e renda muitos outros trabalhos.

## Epígrafe

*“Não existe limite atingível para o que pode ser aprendido ou para como esta sabedoria pode ser colocada em prática.”*

**Vernon I. Cheadle**



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
A FAMÍLIA.....	4
O GÊNERO.....	5
CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	7
<b>MATERIAL BOTÂNICO</b> .....	12
<b>CAPÍTULO 1– MORFOLOGIA, ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE ESPÉCIES DE <i>CLUSIA</i> (CLUSIACEAE)</b> .....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultados - Morfologia da Lâmina Foliar.....	18
Resultados - Anatomia da Lâmina Foliar.....	21
Resultados - Histoquímica da Lâmina Foliar.....	28
Discussão e Conclusão.....	38
<b>CAPÍTULO 2– CARACTERIZAÇÃO EPIDÉRMICA DA LÂMINA FOLIAR DE ESPÉCIES DE <i>CLUSIA</i> (CLUSIACEAE)</b> .....	73
Introdução.....	74
Material e Métodos.....	75
Resultados - Estudos Paradérmicos.....	76
Resultados - Micromorfologia.....	80
Discussão e Conclusão.....	82
<b>CAPÍTULO 3– TIPO DE METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E SUA RELAÇÃO COM A ANATOMIA FOLIAR DE ESPÉCIES DE <i>CLUSIA</i> (CLUSIACEAE)</b> .....	96
Introdução.....	97
Material e Métodos.....	98
Resultados - Aspectos Anatômicos Influenciados pelo Tipo de Metabolismo Fotossintético.....	99
Discussão e Conclusão.....	101

<b>CAPÍTULO 4– EFEITO DA IRRADIAÇÃO SOLAR NA ESTRUTURA, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA FOLIAR DE <i>Clusia criuva</i> Cambess.....</b>	<b>106</b>
Introdução.....	107
Material e Métodos.....	108
Resultados - Efeito da Irradiação Solar na Estrutura Foliar.....	109
Resultados - Efeito da Irradiação Solar na Fotossíntese e Composição Química Foliar.....	111
Discussão e Conclusão.....	114
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>126</b>

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## Figuras

<b>Figura 1</b>	- Aspectos morfológicos das espécies.....	11
<b>Figura 2</b>	- Aspectos da morfologia e arquitetura foliar I.....	48
<b>Figura 3</b>	- Aspectos da morfologia e arquitetura foliar II.....	49
<b>Figura 4</b>	- Detalhe das folhas diafanizadas I.....	50
<b>Figura 5</b>	- Detalhe das folhas diafanizadas II.....	51
<b>Figura 6</b>	- Secções transversais da lâmina foliar I.....	52
<b>Figura 7</b>	- Secções transversais da lâmina foliar II.....	53
<b>Figura 8</b>	- Secções transversais da lâmina foliar III.....	54
<b>Figura 9</b>	- Secções transversais da lâmina foliar IV.....	55
<b>Figura 10</b>	- Secções transversais da lâmina foliar V.....	56
<b>Figura 11</b>	- Secções transversais da lâmina foliar VI.....	57
<b>Figura 12</b>	- Secções transversais da lâmina foliar VII.....	58
<b>Figura 13</b>	- Amostras dissociadas da lâmina foliar I.....	59
<b>Figura 14</b>	- Secções transversais dos feixes vasculares.....	60
<b>Figura 15</b>	- Amostras dissociadas da lâmina foliar II.....	61
<b>Figura 16</b>	- Secções transversais na região da nervura principal I.....	62
<b>Figura 17</b>	- Secções transversais na região da nervura principal II.....	63
<b>Figura 18</b>	- Secções transversais na região da nervura principal III.....	64
<b>Figura 19</b>	- Secções transversais na região da nervura principal IV.....	65
<b>Figura 20</b>	- Secções transversais na região da nervura principal V.....	66
<b>Figura 21</b>	- Secções transversais na região da nervura principal VI.....	67
<b>Figura 22</b>	- Testes histoquímicos I.....	68
<b>Figura 23</b>	- Testes histoquímicos II.....	69
<b>Figura 24</b>	- Testes histoquímicos III.....	70
<b>Figura 25</b>	- Testes histoquímicos IV.....	71
<b>Figura 26</b>	- Testes histoquímicos V.....	72
<b>Figura 27</b>	- Amostras paradérmicas.....	87
<b>Figura 28</b>	- Amostras paradérmicas da superfície abaxial I.....	88
<b>Figura 29</b>	- Amostras paradérmicas da superfície abaxial II.....	89
<b>Figura 30</b>	- Amostras paradérmicas da superfície abaxial III.....	90
<b>Figura 31</b>	- Micromorfologia da superfície adaxial I.....	91
<b>Figura 32</b>	- Micromorfologia da superfície adaxial II.....	92
<b>Figura 33</b>	- Micromorfologia de ambas as superfícies.....	93
<b>Figura 34</b>	- Micromorfologia da superfície abaxial I.....	94
<b>Figura 35</b>	- Micromorfologia da superfície abaxial II.....	95
<b>Figura 36</b>	- Secções transversais da lâmina foliar VIII.....	103
<b>Figura 37</b>	- Secções transversais da lâmina foliar IX.....	104
<b>Figura 38</b>	- Secções transversais da lâmina foliar X.....	105
<b>Figura 39</b>	- Secções transversais e paradérmicas da folha de <i>Clusia criuva</i> .....	120
<b>Figura 40</b>	- Secções transversais da folha <i>Clusia criuva</i> .....	121

## Tabelas

<b>Tabela 1</b>	- Área e razão entre comprimento e largura da lâmina foliar.....	19
<b>Tabela 2</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. burchellii</i> .....	31
<b>Tabela 3</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. criuva</i> .....	32
<b>Tabela 4</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. fluminensis</i> .....	33
<b>Tabela 5</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. gardneri</i> .....	34
<b>Tabela 6</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. insignis</i> .....	35
<b>Tabela 7</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. lanceolata</i> .....	36
<b>Tabela 8</b>	- Localização dos compostos detectados em <i>C. nemorosa</i> .....	37
<b>Tabela 9</b>	- Médias e desvios-padrões dos parâmetros estomáticos.....	78
<b>Tabela 10</b>	- Determinação do tipo de metabolismo fotossintético.....	99
<b>Tabela 11</b>	- Tipo de metabolismo fotossintético e espessura do mesofilo.....	100
<b>Tabela 12</b>	- Análise comparativa das características anatômicas de espécimes de <i>Clusia criuva</i> .....	111
<b>Tabela 13</b>	- Análise comparativa da composição química de espécimes de <i>Clusia criuva</i> .....	112
<b>Tabela 14</b>	- Análise comparativa das características fisiológicas de espécimes de <i>Clusia criuva</i> .....	114

## Gráficos

<b>Gráfico 1</b>	- Regressão linear entre comprimento e densidade estomáticos.....	79
<b>Gráfico 2</b>	- Regressão linear entre largura e densidade estomáticas.....	79
<b>Gráfico 3</b>	- Regressão linear entre razão comprimento/largura e densidade estomáticas.....	80
<b>Gráfico 4</b>	- Relação entre densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa e temperatura foliar.....	112
<b>Gráfico 5</b>	- Relação entre a taxa de fotossíntese e a densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa.....	113

## Morfologia, Anatomia, Histoquímica e Aspectos Fisiológicos da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)

(Fernandes, S. D. C. – Mestrado em Botânica)

**RESUMO:** As lâminas foliares de 14 espécies do gênero *Clusia* foram analisadas em nível anatômico. Para a maioria das espécies também foram feitos estudos sobre a morfologia, histoquímica, micromorfologia e tipos de metabolismo fotossintético. Para as folhas de *C. criuva*, além dos aspectos acima, foi observada a influência da irradiação solar na estrutura, fotossíntese e composição química foliar. As espécies foram coletadas em afloramento rochoso na Mata Atlântica (*Clusia aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. intermedia*, *C. marizii* e *C. spiritusanctensis*), na Restinga (*C. fluminensis*, *C. hilariana*, *C. lanceolata* e *C. parviflora*), em mata de galeria no Cerrado (*C. burchellii*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. nemorosa*) e na Floresta Amazônica (*C. insignis*). As formas das lâminas foliares variam de obovada a elíptica, a margem é inteira, a base levemente assimétrica e decurrente, o pecíolo tem inserção marginal, as folhas são peninérvias, do tipo camptódromo, levemente broquidódromas e com nervura primária proeminente, as nervuras secundárias são de espaçamento uniforme, as intersecundárias são fortes, arcos formados por nervuras de terceira e quarta ordens delineam a venação areolada pouco desenvolvida, a veia última marginal é do tipo fimbrial. Em secção transversal, as principais diferenças entre as espécies são: quantidade de camadas celulares no mesofilo, espessura e forma da nervura principal, cutícula de diferentes alturas e ornamentações, quantidade de drusas, proporção de espaços intercelulares no parênquima lacunoso, número de feixes vasculares na nervura principal, presença de tecido esclerenquimático subepidérmico apenas em *C. burchellii*. Com os testes histoquímicos foram evidenciados compostos lipofílicos e látex no interior dos ductos secretores; a concentração e localização de açúcares redutores são distintas entre as espécies; grãos de amido ocorrem principalmente ao redor do cilindro vascular da nervura principal; os compostos fenólicos, incluindo tanino, foram observados em praticamente todos os tecidos da lâmina foliar. As espécies são hipoestomáticas, com arranjo paracítico e células-guarda reniformes, apresentam distribuição irregular, densidades distintas e formas que variam de circular a elíptica. A densidade é inversamente proporcional ao comprimento estomático, independente da espécie ou da condição ambiental na qual se encontra. Os padrões de deposição das ceras epicuticulares são distintos entre as espécies, assim como o espessamento e ornamentação das fibrilas celulósicas nas paredes das células subsidiárias, e o espessamento das paredes das células-guarda. As características anatômicas das espécies variam de acordo com o tipo de metabolismo fotossintético -  $C_3$ ,  $C_3$ /CAM e CAM, sendo o mesofilo muito mais espesso nas espécies CAM. A variação na disponibilidade de luz também pode alterar as características das folhas de *C. criuva* relacionadas à fotossíntese, como área foliar específica, espessura foliar, alterações na proporção de tecidos fotossintetizantes em relação aos não fotossintetizantes, conteúdo de clorofila e carboidratos.

**Palavras-chave:** densidade estomática, estrutura foliar, Guttiferae, metabolismo  $C_3$  e CAM, micromorfologia.

# Morphology, Anatomy, Histochemistry and Physiological Aspects of *Clusia* Species (Clusiaceae) Leaf Laminas

(Fernandes, S. D. C. – Botanical Master of Science)

**ABSTRACT:** The leaf lamina anatomy of 14 *Clusia* species was studied. For most of the species the analysis also included morphological, histochemical, micromorphological and photosynthetic aspects. The leaves of *C. criuva* were processed to the aspects above and besides, the responses presented by these leaves to changes in light availability were observed in structure, photosynthesis and chemical composition. The samples were collected in Atlantic forest (*Clusia aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. intermedia*, *C. marizii* e *C. spiritu-sanctensis*), in Restinga (*C. fluminensis*, *C. hilariana*, *C. lanceolata* e *C. parviflora*), in a Cerrado-gallery forest (*C. burchellii*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. nemorosa*) and in Amazon forest (*C. insignis*). The leaf lamina shapes vary from obovate to elliptic, the margin type is entire, the base is a little asymmetrical and decurrent, the position of the petiolar attachment is marginal, the leaves are pinnate, camptodromous, weak brochidodromous, the primary vein is prominent, the secondary vein spacing is uniform, there are strong intersecondaries, areoles are poorly developed by the third and fourth order venational, the marginal ultimate venation is compound by a fimbrial vein. The main differences between the transversal sections are number of mesophyll cellular layers, the primary vein thickness and shape, the cuticle thickness and ornamentation, number of druse crystals, the spongy parenchyma intercellular space proportions, number of vascular bundles in the primary vein, presence of sclerenchymatic tissue under the epidermis only in *C. burchellii*. The histochemical analysis showed lipophilic material inside the secretory ducts; the soluble carbohydrates concentration and location are distinct between the species; starch occurs mainly around the vascular cylinder of the primary vein; phenolic material, and also tanin, were observed in almost all leaf lamina tissues. The stomata occur only in the abaxial surface, they are paracytic with kidney-shaped guard cells, in an irregular distribution, with distinct frequency and shapes from circular to elliptic. There is an inverse proportion between stomata frequency and length, this relation is independent of the species or the kind of environment. The epicuticular wax depositions are distinct between the species, as well as the thickness and orientation of the cellulose fibrils in the subsidiary cell walls and the thickness of the guard cell walls. The species anatomy characteristics vary according to the type of photosynthetic metabolism - C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>/CAM and CAM, the mesophyll is thicker in CAM species. The changes in light availability can alter *C. criuva* leaf features related to photosynthesis, leaf specific area, leaf thickness, alterations in the photosynthetic tissues proportion with reference to those non-photosynthetic, carbohydrates and chlorophyll contents.

**Key-words:** C<sub>3</sub> and CAM metabolism, Guttiferae, leaf structure, micromorphology, stomata frequency.

## INTRODUÇÃO GERAL

Clusiaceae Lindley (Guttiferae) tem distribuição quase inteiramente tropical com alguns representantes nas regiões semi-áridas da África, Ásia e Oceania. No Brasil, está representada por 19 gêneros com ampla distribuição nos vários Estados, especialmente na região Amazônica (Barroso, 1978).

Espécies de *Clusia* são de grande interesse paisagístico, manejo ambiental e reflorestamento de áreas de restinga (Correia *et al.*, 1993), sendo que alguns representantes do gênero têm importância na medicina popular, sendo usados como unguentos e tônicos no combate à hipertensão, dores no corpo, úlceras e feridas. González & Matamoros (1997) confirmaram a eficácia do extrato aquoso de *Clusia coclensis* Standl. na diminuição da pressão sanguínea em camundongos hipertensos.

Conhecer as substâncias capazes de causar o efeito medicinal popularmente difundido é uma preocupação que deve ser considerada para garantir a eficácia e segurança do uso de tais drogas. Somente em 1975 foram isolados 4.083 compostos naturais a partir de dicotiledôneas; desses, 1.504 eram de estrutura química inédita (Figliuolo, 1979).

A folha é um dos órgãos mais expostos do vegetal, estando sujeita diretamente às variações do ambiente, sendo um elemento importante para a análise auto-ecológica de uma espécie ou em estudos de comunidades vegetais (Boeger *et al.*, 1997), podendo inclusive apresentar diferenças marcantes quando em diferentes alturas de um mesmo indivíduo (Yáñez-Espinosa *et al.*, 2003). Desta maneira, este órgão foi escolhido para ser analisado, sob diferentes aspectos, ao longo deste estudo.

A utilização da anatomia na sistemática ocorre há cerca de 150 anos e é útil tanto para a identificação prática, quanto para a caracterização das relações filogenéticas entre as plantas (Judd *et al.*, 1999), especialmente quando associados aos aspectos ecológicos e comparativos (Metcalf & Chalk, 1983).

D'Arcy & Keating (1979) realizaram um levantamento das características anatômicas que auxiliam na taxonomia de *Calophyllum* (Clusiaceae) e concluíram que várias características da folha podem ser úteis para compreender a taxonomia e evolução do gênero, sendo que as características mais marcantes para distinção de

espécies são forma e angularidade da nervura principal, presença ou ausência de ductos e presença ou ausência de hipoderme.

Neste trabalho foram estudadas 14 espécies arbóreas - *Clusia aemygdioi* A. Gomes da Silva & B. Weinberg, *Clusia arrudae* Planchon & Triana, *Clusia burchellii* Engler, *Clusia criuva* Cambess., *Clusia fluminensis* Planchon & Triana, *Clusia gardneri* Planchon & Triana, *Clusia hilariana* Schlecht., *Clusia insignis* Martius, *Clusia intermedia* G. Mariz, *Clusia lanceolata* Cambess., *Clusia marizii* A. Gomes da Silva & B. Weinberg, *Clusia nemorosa* G. Meyer, *Clusia parviflora* (Saldanha) Engler e *Clusia spiritusanctensis* G. Mariz & B. Weinberg. A escolha dessas espécies como objeto de estudo é devido ao fato das respectivas flores estarem presentes por apenas um pequeno intervalo de tempo (cerca de 15 dias), além de não manterem suas características quando armazenadas em coleções de herbário, sendo a distinção morfológica baseada em materiais vegetativos e frutos e, desta forma, podendo ser ambígua (Pipoly *et al.*, 1998). Outra dificuldade no estudo das espécies do gênero *Clusia* é que a maioria é dióica e, geralmente existe à disposição apenas o exemplar de um dos sexos para a identificação (Mariz, 1974). Portanto, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) descrever morfológicamente a lâmina foliar, e comparar quantitativa e qualitativamente os tecidos presentes para utilizar as características encontradas como ferramentas para o estudo taxonômico do gênero, por meio da elaboração de uma chave de identificação, permitindo a distinção das espécies em estágio vegetativo;
- 2) realizar triagens histoquímicas para detecção de compostos secretados ou armazenados, que podem servir para a prospecção do(s) princípio(s) ativo(s) dos vegetais para uso medicinal e/ou comercial;
- 3) caracterizar a epiderme das espécies, a fim de demonstrar detalhes das células que possam ser importantes para a caracterização da superfície foliar; além de relacionar as dimensões lineares e a área do estômato com as respectivas densidades, verificando a existência de características específicas;
- 4) identificar os tipos de metabolismo fotossintético e verificar as possíveis relações com a anatomia foliar, assim como as características de cada espécie que indiquem aspectos ecológicos e estratégias de adaptação aos ambientes de



onde se originam, auxiliando, desta maneira, na caracterização ecofisiológica das espécies;

- 5) analisar folhas de sol e de sombra de *C. criuva* Cambess. para identificar as características que respondem aos níveis contrastantes de irradiação solar em nível anatômico, bioquímico e fisiológico.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A FAMÍLIA

De acordo com a classificação filogenética, Clusiaceae Lindley pertence à ordem Malpighiales Martius e é considerada monofilética com base em sinapomorfias químicas e anatômicas; o nome tradicional para a família, Guttiferae, significa “portando goma”, em referência à secreção de coloração variada, característica do grupo (Judd *et al.*, 1999). Nesta família ocorrem aproximadamente 40 gêneros, a maioria deles em regiões tropicais. As cerca de 1200 espécies são predominantemente lenhosas e possuidoras de látex na maioria de seus tecidos (Oliveira *et al.*, 1996).

As espécies desta família possuem hábitos bastante variados, podendo ser plantas arbóreas, epífitas, hemiepífitas ou, ocasionalmente, lianas. Suas principais características são as folhas opostas, coriáceas a cartilaginosas, sem estípulas, com ductos secretores de forma variada, e as flores unissexuadas, as masculinas usualmente com um número indefinido de estames (Gustafsson, 2000).

Clusiaceae circunscreve diversas plantas de valor econômico (Hutchinson, 1969). Suas espécies apresentam diversas utilidades, com vários gêneros conhecidos como produtores de madeira de grande valor, como, por exemplo, *Calophyllum*. Alguns gêneros possuem propriedades medicinais (*Kielmeyera*) e outros são ornamentais, destacando-se o gênero *Clusia* (Andrade, 1987).

No Brasil, a família possui aproximadamente 19 gêneros, sendo que os mais representativos são: *Clusia*, *Kielmeyera*, *Tovomita* e *Vismia*, com ampla distribuição nos vários Estados, especialmente na região Amazônica (Andrade *et al.*, 2002).

Solereder (1908) citou que aspectos anatômicos da família, tais como a distribuição dos canais secretores no caule, raiz e folha; ocorrência de cristais de oxalato de cálcio; raios medulares estreitos; características do aparelho estomático e ausência de pêlos são úteis para a diagnose de gêneros e espécies. Em relação ao mesofilo, mencionou a tendência à esclerificação ou ao espessamento das paredes celulares.

Paula (1974a) realizou estudos sobre esta família, afirmando que, de modo geral, as madeiras apresentam estrutura anatômica bastante heterogênea o que pode

ser usado como subsídio à identificação de gêneros e espécies. Nesse mesmo ano, Paula (1974b) elaborou uma chave taxonômica baseada na quantidade, morfologia e dimensão dos estômatos para algumas espécies do gênero *Clusia*.

Segundo Barroso (1978), as plantas desta família apresentam espaços intercelulares ao longo do mesofilo cheios de secreção. Metcalfe & Chalk (1983) referem-se à presença de ductos secretores que podem seguir o feixe vascular ou correr independentemente deste no mesofilo, passando pela região cortical e medular do pecíolo; também descrevem algumas características das folhas, tais como estômatos paracíticos presentes na epiderme abaxial, hipoderme de uma a várias camadas de células em contato com a epiderme adaxial e presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas nas células do mesofilo.

Em relação ao pecíolo, Stevens (2006) afirmou que a família não apresenta uma homogeneidade anatômica entre os gêneros e espécies.

## O GÊNERO

*Clusia*, pertencente à subfamília Clusioideae Engler, é caracterizado por aproximadamente 300 espécies (Stevens, 2006), distribuídas geograficamente desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (Judd *et al.*, 1999). Podem ocorrer em diversos habitats, como planícies, florestas montanhosas, savanas ou dunas (Gehrig *et al.*, 2003). No Brasil, sua distribuição é mais freqüente na região Amazônica (Andrade *et al.*, 2002), sendo todas sempre verdes e a maioria das espécies lenhosa (IBGE, 1988).

O nome *Clusia* foi proposto por Plumier em 1703, para homenagear o botânico belga Jules Charles de l'Ecluse (Carolus Clusius), um dos pioneiros dos estudos florísticos do Velho Mundo; entretanto, o gênero só foi efetivamente descrito por Linneu em 1753, na primeira edição do "Species Plantarum", tendo *Clusia major* L. como espécie-tipo (Planchon & Triana, 1860).

A primeira referência a uma espécie deste gênero para o Brasil foi feita por Macgrave em 1648, cujo material foi coletado em Pernambuco e posteriormente identificado como *Clusia nemorosa* Meyer (Andrade-Lima *et al.*, 1977).

As espécies deste gênero, além do valor ornamental (Andrade, 1987), também são utilizadas para confecção de artesanatos, como *Clusia amazônica* (Alvino *et al.*, 2005). Na medicina, já foi comprovada a eficácia da atividade antitumoral de extratos de *Clusia rosea* (Díaz-Carballo *et al.*, 2003).

As folhas nas plantas do gênero *Clusia* são simples, opostas, coriáceas a cartilaginosas, pecioladas, dotadas de glândulas (comumente visíveis) ou não e sem odor característico (Machado, 1980). Contêm ductos secretores com óleo ou resina, a qual pode ser amarela ou ter outra cor brilhante (Vieira & Silva, 1992). O pecíolo é reto ou curvo, podendo ter lenticelas na face abaxial, apresenta-se adpresso ao ramo, ocorrendo uma concavidade na face adaxial do órgão (Schneider, 1985).

De acordo com Morretes & Ferri (1972), Sobrado & Medina (1980) e Boeger *et al.* (1997), que estudaram as folhas de algumas espécies do gênero, caracteres habitualmente tidos como de adaptação a ambientes xéricos estão presentes nos espécimes com razoável frequência: cutícula espessa, número elevado de estômatos e abundância de tecido mecânico.

Segundo Borland *et al.* (1998), a hipoderme de *Clusia* funciona como um tecido de armazenamento de água, como exemplos há *C. aripoensis* e *C. minor* que apresentam hipoderme bastante desenvolvida na face adaxial. Kaul (1977) afirmou que as células largas da hipoderme não são capazes de evitar uma perda de água para o ambiente, sendo a cutícula, geralmente espessa, responsável por esta proteção.

As observações do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em *Clusia* são importantes porque representam o primeiro registro de uma árvore dicotiledônea com adaptação a esse metabolismo, dentre as mais de 30 famílias CAM (Ting *et al.*, 1987). Segundo Franco *et al.* (1994), Roberts *et al.* (1998) e Herzog *et al.* (1999), espécies do gênero *Clusia* pertencem a um pequeno grupo de árvores dicotiledôneas que realizam tanto metabolismo C<sub>3</sub> quanto CAM. Franco *et al.* (1990) afirmaram que esta flexibilidade no processo fotossintético possibilitou a dispersão geográfica deste gênero através dos trópicos.

Gehrig *et al.* (2003) realizaram análises de DNA nuclear com o intuito de compreender a origem do mecanismo CAM entre as espécies desse gênero e concluíram que *Clusia* é um gênero monofilético, formando um grupo irmão com os gêneros *Chrysochlamys* e *Tovomitia*. Esta relação também foi mostrada por Gustafsson

*et al.* (2002), quando estudaram a filogenia de Clusiaceae baseada em seqüências do gene *rbcl* de cloroplastos, que também concluíram que o metabolismo CAM deve ter origem múltipla e independente dentro do gênero *Clusia*.

## CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES

Nas espécies estudadas o hábito é arbóreo (Fig. 1a), as folhas são simples, pecioladas, de filotaxia oposta, glabras, com textura variando de coriácea à cartilaginosa, peninérvias, com bordos lisos, sem estípulas, discolors (face abaxial verde clara e adaxial mais escura), com secreção de coloração branca a amarelada, flores unissexuadas, actinomorfas com cálice imbricado, reunidas em inflorescências cimosas, apicais e axilares, com órgãos sexuais totalmente expostos (Fig. 1b), número variável de estames, frutos do tipo cápsula, alongados, secos e com deiscência septicida (Fig. 1c).

*Clusia aemygdioi* possui folhas obovadas e cartilaginosas, botão floral globoso e imbricado, suas flores são amarelo claro com centro vermelho escuro, sendo caracterizada por ausência de estaminódios na flor masculina, os verticilos férteis são amarelados. O seu tipo foi coletado no município Domingos Martins – ES, em 1985, o epíteto específico é homenagem a Luiz Emygdioi de Mello Filho, pioneiro que introduziu o gênero em estudos ecológicos (Silva & Weinberg, 1985).

*Clusia arrudae* possui folhas obovadas e coriáceas, suas flores apresentam pétalas brancas com centro avermelhado, ou totalmente vermelhas, os estaminódios são discretos, estigma e fruto jovem verdes. Seu tipo foi coletado no Rio de Janeiro por J. A. Casaretto (Stevens, 2006).

*Clusia burchellii* possui folhas obovadas, coriáceas a carnosas, suas flores apresentam sépalas verdes, pétalas vermelhas (Fig. 1b), filetes verdes e anteras marrons, estilete e estigma amarelos, frutos imaturos verdes e vermelhos. Popularmente esta planta é conhecida como gameleira (Corrêa, 1931). Seu tipo foi coletado em Goiás por Burchell (Stevens, 2006).

*Clusia criuva* possui folhas carnosas, oblongas a obovadas, curto-pecioladas (Corrêa, 1931). Suas flores são pentâmeras de cor branca, apresentam sépalas e

filetes verdes, e anteras, estilete e estigma amarelos (Fig. 1d), o gineceu é circundado por estaminódios amarelos, o fruto é verde quando jovem, contendo duas ou mais sementes com arilo de cor abóbora (Correia *et al.*, 1993). Seu tipo foi coletado em Minas Gerais por A. de Saint Hilaire em 1828.

*Clusia fluminensis* possui folhas obovadas, carnosas a coriáceas, suas flores são brancas, estames amarelos e anteras laranjas. Seu tipo foi coletado no Rio de Janeiro por Gaudichaud em 1833 (Stevens, 2006).

*Clusia gardneri* possui folhas elípticas, semi-crassas a coriáceas, suas flores apresentam coloração vinho no centro e branco no restante das pétalas, estilete e estigma são verdes, o fruto é de cor verde com glândulas pretas quando imaturo (Fig. 1e), sendo a semente com arilo vermelho (Fig. 1c). Seu tipo foi coletado em Goiás, por Gardner em 1842 (Stevens, 2006).

*Clusia hilariana* possui folhas obovadas e crassas, suas flores são totalmente brancas, ou brancas com interior rosa, ou totalmente rosas, o estigma e os estames são amarelo claro, o botão floral é esverdeado e o fruto jovem é verde amarelado. O tipo de *C. hilariana* foi coletado no Espírito Santo por A. de Saint Hilaire em 1888 (Stevens, 2006), sendo o epíteto em homenagem ao mesmo. De acordo com Vesque (1893), *C. hilariana*, por ser do tipo crassifoliado, deriva diretamente de *C. lanceolata*.

*Clusia insignis*, cujo tipo foi coletado em Manaus-AM por Spruce em 1805 (Stevens, 2006), possui pétalas com centro vermelho escuro e bordos brancos, estaminódios estão presentes, esta espécie é cultivada como ornamental no Brasil e na Venezuela (Maguire, 1977). Em Pernambuco foram introduzidas *C. insignis* e *C. fluminensis* como ornamentais em praças e jardins (Andrade, 1987).

*Clusia intermedia* possui folhas oblongas e coriáceas, suas flores são esverdeadas, o botão floral é esbranquiçado e o fruto jovem amarelo. *Clusia intermedia* foi uma das duas novas espécies do gênero descritas por Mariz (1974) para Pernambuco. Seu epíteto é relativo à posição intermediária do tipo, por ser tetrâmero, o que a afastaria das demais espécies de *Clusia* e a aproximaria de outro gênero.

*Clusia lanceolata* possui folhas elípticas e subcoriáceas, suas flores são amarelo claro com manchas vermelhas na periferia e fundo castanho, os verticilos férteis são amarelos, o botão floral é vermelho e os frutos vináceos. O tipo foi coletado na Venezuela por Saint Hilaire em 1845 (Stevens, 2006). Machado & Emmerich (1981)

analisaram a presença de coléteres na região proximal do pecíolo de *C. lanceolata*, descrevendo a forma, estrutura e função, citaram ainda a ocorrência de formações semelhantes em *C. fluminensis*.

Silva & Weinberg (1984) descreveram *C. marizii*, uma nova espécie cuja localidade tipo é Cachoeiro de Itapemirim-ES. O epíteto específico foi homenagem a Geraldo Mariz, especialista no gênero, segundo os autores esta espécie é próxima de *C. fluminensis* e *C. spiritu-sanctensis*. As folhas são oblongo-elipsóides e subcoriáceas, as inflorescências são tri a multiflora, as flores possuem pétalas vermelhas escuras, estames livres dispostos em dois ciclos, estaminódios nas femininas, frutos verdes quando maduros, arilo alaranjado nas sementes. De acordo com IPEMA (2007), *C. aemygdioi* e *C. marizii* são espécies incluídas no projeto de conservação da biodiversidade da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo porque estão ameaçadas de extinção nessa região.

*Clusia nemorosa* possui folhas oblongas e cartáceas, flores com pétalas brancas e, ao redor dos verticilos férteis é rosado (Fig. 1f), os estames são marrons, a secreção é produzida por estaminódios nas flores de ambos os sexos (Mesquita & Franciscon, 1995). O tipo de *C. nemorosa* foi coletado no Suriname por Rodschied, seu epíteto significa “a que mora na mata”, por ser freqüente nesse tipo de cobertura vegetal.

*Clusia parviflora*, cujo tipo foi coletado por Saint Hilaire em 1888, possui folhas obovadas e coriáceas, suas flores são brancas e os frutos verdes. Nogueira *et al.*(2001) a consideram bastante similar a *C. criuva*, morfo e bioquimicamente, e afirmaram que, provavelmente, seria melhor tratá-la como subespécie desta.

Mariz & Weinberg (1982) descreveram *C. spiritu-sanctensis* como uma nova espécie do gênero, encontrada em Vila Velha – ES. Os tipos estão depositados no Rio de Janeiro e em Pernambuco. Na diagnose da espécie enfatizaram os aspectos morfológicos da folha e do aparelho reprodutor feminino e masculino, sendo próxima de *C. fluminensis*, da qual difere pelo número de estames e estaminódios. As flores possuem pétalas brancas e verticilos férteis amarelos.

Schneider (1985) descreveu a anatomia foliar de *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis* ocorrentes no Estado do Espírito Santo. Além das quantidades de camadas celulares diversas em cada um dos tecidos das duas espécies, verificou que *C. hilariana* apresenta cutícula espessa com ornamentação nas paredes anticlinais

externas, medula parenquimática do cilindro vascular do pecíolo escassa ou ausente e estômatos com crista cuticular. Contudo, *C. spiritu-sanctensis* é caracterizada por cutícula espessa, lisa e apresentando flanges, presença de medula parenquimática no cilindro vascular do pecíolo e estômatos com pequena câmara subestomática. De acordo com a autora, essas diferenças quantitativas e qualitativas nos tecidos das duas espécies podem ser utilizadas no auxílio da taxonomia.

A natureza química dos compostos voláteis pode estar relacionada com a taxonomia das espécies e a interação entre os tipos de polinizadores observados (Fahn, 2000). Nogueira *et al.* (2001) verificaram a composição de compostos voláteis de flores masculinas e femininas de *C. grandiflora*, *C. parviflora* e *C. spiritu-sanctensis*, entretanto, não encontraram muita distinção entre os produtos destas espécies.

Assis *et al.* (2004) realizaram um estudo de fitossociologia de uma floresta no estado do Espírito Santo e consideraram *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis* espécies raras em florestas de restinga degradadas. Essas espécies são consideradas pioneiras ou facilitadoras da entrada de outras espécies na comunidade.





**Fig. 1.** Aspectos morfológicos das espécies de *Clusia* que ocorrem em mata de galeria no Cerrado. **A:** aspecto geral do vegetal. **B:** folhas e inflorescência feminina de *Clusia burchellii*. **C:** fruto e sementes de *Clusia gardneri*. **D:** inflorescências masculina e feminina de *Clusia criuva*. **E:** inflorescência feminina e fruto de *Clusia gardneri*. **F:** inflorescência feminina de *Clusia nemorosa*.

## MATERIAL BOTÂNICO

As 14 espécies arbóreas deste estudo foram coletadas em afloramento rochoso na Mata Atlântica (*Clusia aemygdioi*, *Clusia arrudae*, *Clusia intermedia*, *Clusia marizii* e *Clusia spiritu-sanctensis*), na Restinga (*Clusia fluminensis*, *Clusia hilariana*, *Clusia lanceolata* e *Clusia parviflora*), em mata de galeria no Cerrado (*Clusia burchellii*, *Clusia criuva*, *Clusia gardneri* e *Clusia nemorosa*) e na Floresta Amazônica (*Clusia insignis*).

Amostras das espécies *C. aemygdioi*, *C. intermedia*, *C. marizii* e *C. spiritu-sanctensis* foram coletadas na Reserva Biológica Santa Lúcia, Santa Tereza - ES. *Clusia arrudae* é oriunda da Serra de São José, Tiradentes - MG. As espécies *C. hilariana*, *C. parviflora* são originárias dos arredores de Macaé - RJ, e *C. fluminensis* e *C. lanceolata* dos arredores de Maricá - RJ. Amostras de *C. insignis* foram coletadas em Porto Trombetas - PA. As amostras dessas espécies são de indivíduos femininos, também foram coletadas amostras do indivíduo masculino de *C. intermedia*. O material vegetal foi previamente fixado em formaldeído : ácido acético : etanol 70% (FAA 70%) na proporção 1:1:18 por 24h, preservado em etanol 70% e enviado ao Laboratório de Anatomia Vegetal – UnB pelo Prof. Dr. Fábio Rúbio Scarano (Departamento de Ecologia UFRJ).

As espécies do Cerrado (*C. burchellii*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. nemorosa*) foram coletadas na Reserva Ecológica do Córrego do Roncador – RECOR/IBGE - DF em julho/2005 e janeiro/2006, matas nos arredores de Cavalcante - GO em dezembro/2005 e Estação Ecológica Águas Emendadas – DF em junho/2006. Em todas essas coletas foram encontrados materiais férteis (flores e/ou frutos), confeccionadas exsicatas que, posteriormente foram incorporadas no herbário IBGE, com os seguintes números de tombo:

- *Clusia burchellii*: 62681, 62682, 62683, 62684, 62688, 62689, 62744, 62745, 62747;
- *Clusia criuva*: 62680, 62687, 62691, 62692, 62743, 64748;
- *Clusia gardneri*: 62679, 62685, 62686, 62690, 62746;
- *Clusia nemorosa*: 63432.

As duplicatas foram submetidas para o herbário da Universidade de Brasília (UB) e da Universidade Estadual de Campinas - SP (UEC). As espécies foram identificadas pelo Dr. Volker Bittrich.

Amostras dos indivíduos de ambos os sexos de *C. criuva* foram coletadas na RECOR/IBGE - DF, nas coordenadas geográficas 15°56'254"S – 47°53'193"W, e em Cavalcante - GO (13°35'066"S – 47°31'417"W e 14°00'167"S – 47°31'235"W). Para esta espécie também foram realizados estudos sobre a influência do ambiente (níveis contrastantes de irradiação solar) na estrutura, fotossíntese e composição química. As amostras, incluindo os pecíolos, foram obtidas de quatro plantas, sendo duas localizadas na borda de uma mata de galeria (ambiente de sol) e duas localizadas no interior da mata (ambiente de sombra). As duas coletas realizadas -julho/2005 e janeiro/2006 – correspondem respectivamente às estações de seca e de chuva.

Em Cavalcante - GO, também foram coletadas amostras de ambos os sexos de *C. burchellii* (13°41'595"S – 47°28'110"W, 13°47'228"S – 47°20'177"W e 13°49'334"S – 47°27'162"W) e femininas de *C. gardneri* (13°37'708"S – 47°28'305"W).

Amostras dos indivíduos femininos de *C. nemorosa* foram coletadas na Estação Ecológica Águas Emendadas - DF (15°32'577"S – 47°34'690"W).

## CAPÍTULO 1 - MORFOLOGIA, ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE ESPÉCIES DE *CLUSIA* (CLUSIACEAE)

**RESUMO:** As lâminas foliares de 14 espécies de *Clusia* foram examinadas em nível anatômico, destas, 8 também foram analisadas em nível morfológico e 7 em nível histoquímico. As formas das lâminas foliares variam de obovada a elíptica, a margem é inteira com base levemente assimétrica e decurrente, o pecíolo tem inserção marginal, as folhas são peninervias, do tipo camptódromo, levemente broquidódromas e com nervura primária proeminente, as nervuras secundárias são de espaçamento uniforme, as intersecundárias são fortes, arcos formados por nervuras de terceira e quarta ordens delineam a venação areolada pouco desenvolvida, a veia última marginal é do tipo fimbrial. Em secção transversal as folhas apresentam epiderme unisseriada, com células de formas e tamanhos variados, recobertas por cutícula espessa, com flanges; em sua face abaxial a epiderme apresenta células comuns menores e a cutícula menos espessa que na face adaxial. As espécies são hipoestomáticas e os estômatos apresentam cristas cuticulares e são nivelados em relação às demais células epidérmicas, podendo haver câmara subestomática. O mesofilo é heterogêneo bifacial, presença de ductos secretores e drusas. Ocorre hipoderme adaxial de 1-6 estratos com células aclorofiladas, isodiamétricas, com disposição tabular e paredes espessas. O parênquima paliçádico é constituído por 1-9 camadas de células alongadas. A região de transição entre os parênquimas paliçádico e lacunoso apresenta nervuras de médio e pequeno porte, compostas por feixes vasculares colaterais, envoltas por bainha parenquimática, ou esclerenquimática em *C. gardneri* e *C. hilariana*. O parênquima lacunoso é composto por 12-30 camadas, entre as quais ocorrem espaços intercelulares de diâmetros distintos e células isodiamétricas a braciiformes. A nervura principal é a que apresenta maior variabilidade entre as espécies, nesta região os feixes vasculares estão dispostos em forma de círculo à elipse. Ocorre tecido esclerenquimático subepidérmico apenas em *C. burchellii*. Com os testes histoquímicos foram evidenciados compostos lipofílicos no interior dos ductos secretores; a concentração e localização de açúcares redutores são distintas entre as espécies; grãos de amido ocorrem principalmente ao redor do cilindro vascular da nervura principal; os compostos fenólicos, incluindo tanino, foram observados em praticamente todos os tecidos da lâmina foliar. Não houve distinção qualitativa dos compostos presentes na lâmina foliar das espécies analisadas. No entanto, de acordo com as diferenças morfológicas e anatômicas encontradas é possível o reconhecimento das espécies em estágio vegetativo.

**Palavras-chave:** anatomia, *Clusia*, folha, histoquímica, venação.

**Agradecimentos:** Ao Prof. MSC. José Geraldo Antunes de Paiva pelo empréstimo dos reagentes para os testes histoquímicos e ao Fausto pelas fotografias das folhas diafanizadas.

## Introdução

Clusiaceae é composta por diversas plantas de valor econômico (Hutchinson, 1969). Suas espécies apresentam diversas utilidades, com gêneros produtores de madeira de grande valor (*Calophyllum*), possuidores de propriedades medicinais (*Kielmeyera*) e ornamentais *Clusia* (Andrade, 1987).

*Clusia* é caracterizado por cerca de 300 espécies (Stevens, 2006), distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (Judd *et al.*, 1999). Pode ocorrer em diferentes ambientes, como planícies, florestas montanhosas, savanas ou dunas (Gehrig *et al.*, 2003). No Brasil, sua distribuição é mais freqüente na região Amazônica (Andrade *et al.*, 2002), sendo todas sempre verdes e a maioria das espécies lenhosa (IBGE, 1988).

A identificação das espécies deste gênero é geralmente feita com base nas características dos órgãos reprodutivos, no entanto as respectivas flores estão presentes por apenas um pequeno intervalo de tempo (cerca de 15 dias), e não mantém suas características quando armazenadas em coleções de herbário (Pipoly *et al.*, 1998).

De acordo com Hickey (1974), as folhas são raramente utilizadas em estudos morfológicos comparativos e taxonômicos, devido à falta de uma classificação detalhada, padronizada e não ambígua. Uma descrição precisa das características da folha pode auxiliar consideravelmente a classificação, além de permitir o estudo de efeitos do ambiente no vegetal.

Estudos anatômicos podem subsidiar trabalhos taxonômicos. D'Arcy & Keating (1979) realizaram um levantamento das características anatômicas que auxiliam a taxonomia de *Calophyllum* (Clusiaceae) e concluíram que vários caracteres da folha podem ser úteis para compreender a taxonomia e evolução deste gênero.

Este trabalho visa a descrição morfológica, anatômica e histoquímica da lâmina foliar de espécies de *Clusia* para permitir sua identificação em estágio vegetativo. Os estudos histoquímicos podem gerar informações que fornecem elementos de comparação qualitativa para identificação de compostos para uso comercial e/ou medicinal.

## Material e Métodos

A caracterização morfológica inicial das folhas e o registro fotográfico foram realizados no campo, e as complementações de medidas, análises e descrições no laboratório. Todas as espécies apresentaram contaminação por fungos nas folhas maduras, característica ausente nas folhas jovens.

As técnicas morfológicas foram aplicadas às espécies *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. hilariana*, *C. insignis*, *C. lanceolata* e *C. nemorosa*. Duas folhas totalmente expandidas, retiradas a partir do 2º nó a contar do ápice de um ramo adulto foram selecionadas de cada um dos dois indivíduos analisados por espécie. Para as demais espécies não foi aplicada esta técnica porque as mesmas foram enviadas já fracionadas.

A desidratação do material durante o transporte foi evitada através de seu acondicionamento em sacos plásticos e câmara fria. As folhas foram submetidas ao processo de diafanização (modificado de Shobe & Lersten, 1967 - *apud* Kraus & Arduin, 1997), com o objetivo de evidenciar a arquitetura foliar, acrescentando a limpeza do material com esponja e sabão neutro, com o intuito de retirar o excesso de cera e acelerar o processo.

A montagem das lâminas foliares foi feita entre duas placas de vidro em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006), e a ampliação em papel fotográfico branco e preto usando os espécimes como positivo para geração da imagem em negativo no papel. A classificação e a descrição da arquitetura das folhas foram realizadas de acordo com Hickey (1974 e 1979).

As secções transversais das regiões medianas das folhas das 14 espécies deste estudo foram realizadas à mão livre e com infiltração e inclusão dos materiais em parafina ou historesina Leica®. Cinco folhas, de cada um dos quatro indivíduos analisados por espécie, foram selecionadas e coletadas conforme descrito anteriormente. A limpeza do material foi realizada com pincéis e imersão em água com posterior preservação em álcool etílico 70% (Jensen, 1962), permanecendo imerso neste líquido até etapas posteriores do processamento.

As secções realizadas à mão livre foram feitas em micrótomo de mesa (R. Jungag Heidelberg), clarificadas por cerca de 4h com solução de hipoclorito de sódio

50% (Kraus & Arduin, 1997), coradas por 5min com safranina 1% e azul de alcião 1% aquosos na proporção 5:1 (Luque *et al.*, 1996). Algumas secções foram montadas entre lâmina e lamínula em gelatina glicerinada de Kaiser (1880) como meio de montagem; outras foram desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila e montadas em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006).

Para a infiltração e inclusão em parafina, o material foi desidratado em série etílica crescente, até a saturação (etanol absoluto), diafanizado em xilol, infiltrado e incluído. As secções foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM 2145, afixadas em lâminas histológicas, submetidas aos corantes safranina 1% em álcool 50% por 20min e passadas rapidamente no verde firme 0,5% em álcool 100% (Johansen, 1940) e montadas entre lâmina e lamínula em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006).

A infiltração e inclusão em historesina Leica® seguiu as orientações do fabricante. As secções foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM 2145, afixadas em lâminas histológicas, submetidas aos corantes fucsina básica 0,0125% aquosa por 1min e azul de astra 1% aquoso por 40min em estufa 60°C (Roeser, 1972 – *apud* Kraus & Arduin, 1997), lavadas em água, secas à temperatura ambiente e montadas em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006).

Porções das folhas foram submetidas à solução de Franklin (1946 - *apud* Kraus & Arduin, 1997) e mantidas em estufa 40°C por cerca de 3 dias até a dissociação dos tecidos, para obtenção de células livres. A solução foi filtrada em tecido sintético durante quatro lavagens em água destilada, a suspensão foi corada com safranina 1% em álcool 50% e montada entre lâmina e lamínula usando gelatina glicerinada de Kaiser (Kraus & Arduin, 1997) como meio de montagem.

Para os testes histoquímicos, amostras de lâminas foliares, sem qualquer tratamento (amostras fixadas não foram submetidas aos testes), foram envoltas em papel alumínio e congeladas a -4°C para a preservação de suas características bioquímicas até o preparo das secções. As espécies analisadas foram *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. insignis*, *C. lanceolata* e *C. nemorosa*, sendo que para cada teste foram feitas 3 repetições por espécie.

Foram utilizadas secções feitas à mão livre e submetidas a reagentes específicos; segundo Kraus & Arduin (1997): teste de Fehling (Purvis *et al.*, 1964) para açúcares redutores; reagente de Steinmetz (Costa, 1970) para amido, celulose, cutina,

suberina, outros compostos lipofílicos, mucilagem e lignina; lugol (Langeron, 1949) para grãos de amido; cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962) para grãos de amido, celulose e lignina; ácido acético glacial e sulfúrico 10% (Corso, 1991) para composição química dos cristais; sudan III e IV (Jensen, 1962) para cutina, suberina, mucilagem e outros compostos lipofílicos.

Outros testes histoquímicos foram efetuados de acordo com Johansen (1940): solução de acetato cúprico aquoso 7% para resinas; solução aquosa de vermelho de rutênio 0,02% para substâncias pécticas; solução saturada aquosa de ácido pícrico por 24h e reação conjugada às soluções aquosas de ferrocianeto de potássio seguida de cloreto férrico 5% para corpos protéicos; dicromato de potássio aquoso 10% e solução aquosa de formalina 5% e sulfato ferroso 10% para compostos fenólicos; floroglucinol clorídrico para lignina; cristais de fenol para sílica; sulfato ferroso aquoso para taninos.

Os teste histoquímicos realizados de acordo com Ascensão (2003) foram: reagentes de Ellran (Furr & Mahlberg, 1981) e Dragendorff (Svendsen & Verpoorte, 1983) para alcalóides; acetato neutro de chumbo aquoso 3% (Charrière-Ladreix, 1976) e cloreto de alumínio aquoso 15% (Charrière-Ladreix, 1976) para compostos fenólicos; vanilina clorídrica 0,5% em ácido clorídrico 9% (Mace & Howell, 1974) para taninos; azul brilhante de Coomassie (Fisher, 1968) para proteínas.

Além desses, azul de metileno para celulose (Langeron, 1949), sulfato de anilina para lignina (Morita & Assumpção, 1972). Os controles foram feitos com as secções sem qualquer tratamento ou conforme especificado pelos autores.

As fotomicrografias de todas as secções transversais foram obtidas com auxílio do microscópio Olympus CX 31 acoplado à máquina digital.

## Resultados - Morfologia da Lâmina Foliar

Foi realizado o estudo morfológico da lâmina foliar das espécies *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. hilariana*, *C. insignis*, *C. lanceolata* e *C. nemorosa*. Para as demais espécies não foi possível aplicar esta técnica porque as amostras foram enviadas já fracionadas.

A forma das lâminas foliares das 8 espécies analisadas variam de obovada a elíptica (Figs. 2 e 3). *Clusia burchellii* (Fig. 2a) e *C. fluminensis* (Fig. 2c) possuem forma



obovada; *C. criuva* (Fig. 2b), *C. gardneri* (Fig. 2d), *C. hilariana* (Fig. 3a), *C. insignis* (Fig. 3b), *C. lanceolata* (Fig. 3d) e *C. nemorosa* (Fig. 3c) possuem forma elíptica.

A área foliar (cm<sup>2</sup>) das espécies varia de 13,06 ± 0,69 em *C. lanceolata* a 81,07 ± 1,35 em *C. nemorosa* (Tab. 1). A razão comprimento/largura para as espécies com folhas obovadas é a mesma (1,3 : 1,0) e a menor dentre as espécies, para as elípticas esta razão varia de 1,6: 1,0 a 2,5 : 1,0 (Tab. 1). De acordo com a dimensão da área foliar, todas as espécies foram classificadas como macrofilos, com exceção de *C. lanceolata*, do tipo mesofilo.

**Tab. 1.** Área (cm<sup>2</sup>) e razão entre comprimento e largura da lâmina foliar das espécies estudadas. Valores expressos em média ± desvio-padrão

Espécie	Área Foliar	Comprimento / Largura
<i>Clusia burchellii</i>	77,27 ± 1,02	1,3 : 1,0
<i>Clusia criuva</i>	46,20 ± 2,37	1,8 : 1,0
<i>Clusia fluminensis</i>	62,34 ± 0,56	1,3 : 1,0
<i>Clusia gardneri</i>	54,60 ± 2,01	2,0 : 1,0
<i>Clusia hilariana</i>	65,60 ± 1,95	1,6 : 1,0
<i>Clusia insignis</i>	42,50 ± 0,86	2,5 : 1,0
<i>Clusia lanceolata</i>	13,06 ± 0,69	1,6 : 1,0
<i>Clusia nemorosa</i>	81,07 ± 1,35	2,1 : 1,0

Todas as folhas possuem margem inteira (Figs. 2 e 3), base levemente assimétrica, decurrente, com ângulo agudo e são pecioladas, possuindo o pecíolo inserção marginal e base dilatada.

Em relação ao ápice, o ângulo é agudo em *C. criuva* (Fig. 2b), *C. insignis* e *C. nemorosa* (Fig. 3c); e obtuso em *C. burchellii* (Fig. 2a), *C. fluminensis* (Fig. 2c), *C. gardneri* (Fig. 2d), *C. hilariana* (Fig. 3a) e *C. lanceolata* (Fig. 3d). A forma do ápice é arredondada em *C. burchellii* (Fig. 2a), *C. criuva* (Fig. 2b) e *C. fluminensis* (Fig. 2c); e retusa em *C. gardneri* (Fig. 2d), *C. hilariana* (Fig. 3a), *C. insignis*, *C. lanceolata* (Fig. 3d) e *C. nemorosa* (Fig. 3c).

As folhas são peninérvias, do tipo camptódromo, levemente broquidódromas e com nervura primária de orientação reta (Figs. 2 e 3), proeminente somente na face abaxial, com maior calibre na base, atenuando em direção ao ápice. Dependendo da espécie, diferentes quantidades de pares de nervuras secundárias originam-se de maneira alterna, por vezes oposta, divergindo gradualmente em ângulos entre agudo e

reto. *Clusia lanceolata* apresenta cerca de 10 pares de nervuras secundárias; *C. burchellii* (Fig. 2a), *C. fluminensis* (Fig. 2c) e *C. hilariana* (Fig. 3a) apresentam aproximadamente 16 pares; *C. gardneri* (Fig. 2d), *C. insignis* (Fig. 3b) e *C. nemorosa* apresentam até 22 pares e *C. criuva* (Fig. 2b) apresenta até 28 pares.

O espaçamento das nervuras secundárias é uniforme (Figs. 4a e 4b), os ângulos são uniformes e agudos moderados (Figs. 4d, 4e e 4f), exceto em *C. criuva* (Figs. 2b e 4b) e *C. nemorosa* (Fig. 5a) que são agudo amplo a reto. As veias intersecundárias são fortes, com origem exmedial e ângulos agudos (Fig. 4), a maior concentração destas veias ocorre em *C. insignis* (Fig. 4f).

No ápice da lâmina foliar os ângulos agudos das nervuras secundárias tornam-se mais reduzidos para *C. fluminensis* (Fig. 2c), *C. gardneri* (Fig. 2d), *C. hilariana*, *C. insignis*, *C. lanceolata* (Fig. 3d); sendo que em *C. hilariana* (Fig. 3a) essas nervuras se inclinam exmedialmente em direção ao ápice. Em *C. burchellii* (Fig. 2a) os ângulos são agudos amplos a retos, exceto no ápice onde se tornam obtusos. Em *C. criuva* (Fig. 2b) os ângulos são quase retos, e no ápice há redução angular. Em *C. nemorosa* (Fig. 5a) os ângulos são agudos amplos.

As nervuras terciárias originam-se em ângulo predominantemente reto (Fig. 4a) e uniforme (Fig. 5a), são exmedialmente ramificadas, o modelo de venação é reticulado aleatório (Fig. 5b), a disposição é densa, predominantemente alterna. Arcos formados por nervuras de terceira e quarta ordens (Figs. 5c e 5d) delineam a venação areolada pouco desenvolvida, com tamanho e forma bastante irregulares ao longo de toda a lâmina foliar. A quarta venação é do tipo dicotômica e as vênulas são bastante ramificadas (Fig. 5e).

As ramificações nas veias de terceira e quarta ordens são maiores na região do ápice para *C. gardneri*, *C. insignis* e *C. lanceolata*; para *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. fluminensis*, *C. hilariana* e *C. nemorosa* as ramificações estão uniformemente distribuídas ao longo da lâmina foliar.

A veia última marginal é do tipo fimbrial (Figs. 2, 3a e 3b), apresentando invaginações nas áreas de contato com as nervuras secundárias (Figs. 3d, 4c e 5b); nas espécies *C. burchellii* (Fig. 2a), *C. criuva*, *C. fluminensis* (Fig. 2c), *C. lanceolata* (Fig. 3d) e *C. nemorosa* também existe invaginação na área de contato com a nervura

primária. A disposição desta veia é periférica em *C. criuva*, *C. insignis* e *C. nemorosa* (Fig. 5b), e subperiférica nas demais espécies (Fig. 4c).

## Resultados - Anatomia da Lâmina Foliar

Em secção transversal a lâmina foliar das 14 espécies estudadas apresenta forma linear de espessuras diversas (Figs. 6-12). A epiderme na face adaxial apresenta-se uniestratificada, havendo somente células epidérmicas comuns (Figs. 6-9), as espécies que possuem células com formas quadradas são *C. aemygdioi* (Fig. 6a), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. burchellii* (Fig. 6c), *C. criuva* (Fig. 6d), *C. fluminensis* (Fig. 7a), *C. gardneri* (Fig. 7b), *C. hilariana* (Fig. 7c), *C. insignis* (Fig. 7d), *C. intermedia* (Figs. 8a e 8b), *C. nemorosa* (Fig. 8c) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 8d); as que possuem formas retangulares, com eixo periclinal maior que anticlinal, são *C. lanceolata* (Fig. 9a), *C. marizii* (Fig. 9b) e *C. parviflora* (Fig. 9c). Essas células são recobertas por cutícula espessa de diferentes alturas e aspectos.

A cutícula é mais delgada em *C. fluminensis* (Fig. 7a) e mais espessa em *C. insignis* (Fig. 7d). As espécies *C. aemygdioi* (Fig. 6a), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. gardneri* (Fig. 7b), *C. insignis* (Fig. 7d), *C. intermedia* (Figs. 8a e 8b), *C. marizii* (Fig. 9b) e *C. nemorosa* (Fig. 8c) apresentam ornamentações. As espécies *C. burchellii* (Fig. 6c), *C. criuva* (Fig. 6d), *C. fluminensis* (Fig. 7a), *C. hilariana* (Fig. 7c), *C. lanceolata* (Fig. 9a), *C. parviflora* (Fig. 9c) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 8d) apresentam cutícula lisa, desprovida de ornamentações. Em todas essas espécies, a cutícula, independentemente de possuir ornamentações ou não, penetra por entre as paredes anticlinais, determinando a formação de flanges cuticulares.

A epiderme em sua face abaxial é uniestratificada, as células epidérmicas comuns são menores, principalmente em relação ao eixo periclinal, e a cutícula que recobre esta superfície é menos espessa que a da face adaxial (Figs. 6b, 8b, 9c, 10d e 12c); presença ou ausência de ornamentações seguem o padrão das respectivas superfícies adaxiais. As espécies analisadas são hipoestomáticas e os estômatos são nivelados em relação às demais células epidérmicas (Figs. 10-12). As células-guarda possuem espessamentos nas paredes periclinais externas e anticlinais, havendo projeção em duas pequenas cristas em todas as espécies estudadas, sendo que em *C.*

*aemygdioi* (Fig. 9d e 12d), *C. arrudae*, *C. gardneri* (Fig. 10c), *C. hilariana* (Fig. 11a), *C. insignis* (Fig. 11b) e *C. parviflora* as cristas são mais proeminentes. As células subsidiárias são maiores que as demais células epidérmicas da região, e podem possuir espessamentos nas paredes anticlinais que margeiam as células epidérmicas comuns adjacentes (Fig. 12f). Câmara subestomática é observada em *C. aemygdioi* (Fig. 9d e 12d), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. criuva* (Fig. 10b), *C. gardneri* (Fig. 10c), *C. intermedia* (Fig. 8b e 10d), *C. lanceolata* (Fig. 11d), *C. marizii* (Fig. 12a e 12f), *C. nemorosa* (Fig. 11c), *C. parviflora* (Fig. 9c) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 12b). Em *C. burchellii* (Fig. 10a e 12e), *C. fluminensis* (Fig. 12c), *C. hilariana* (Fig. 11a) e *C. insignis* (Fig. 11b) a câmara subestomática está ausente ou é discreta, quando presente em *C. burchellii* (Fig. 12e) interrompe a camada esclerificada subepidérmica.

*Clusia burchellii* é a única espécie que possui tecido subepidérmico esclerenquimático em ambas as faces (Figs. 6c e 10a), composto por uma única camada de astroesclereídeos e esclereídeos raquiformes, tipos celulares encontrados somente nesta espécie (Figs. 13a e 13b).

O mesofilo é heterogêneo bifacial, apresentando ductos secretores de diâmetros variados e origem esquizógena, além de idioblastos com cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas em praticamente todas as camadas (Figs. 6-12).

É observada hipoderme adaxial de 1-6 estratos de células aclorofiladas, isodiamétricas, com disposição tabular e paredes espessas, podendo conter no seu interior gotículas lipídicas. *Clusia insignis* (Fig. 7d) possui apenas uma camada de células neste tecido. *Clusia nemorosa* (Fig. 8c) possui aproximadamente 2 camadas celulares. *Clusia burchellii* (Fig. 6c) e *C. gardneri* (Fig. 7b) apresentam cerca de 3 camadas celulares. *Clusia aemygdioi* (Fig. 6a), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. criuva* (Fig. 6c), *C. fluminensis* (Fig. 7a), *C. hilariana* (Fig. 7c), *C. intermedia* (Figs. 8a e 8b), *C. lanceolata* (Fig. 9a), *C. marizii* (Fig. 9b) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 8d) possuem de 4-5 estratos. *Clusia parviflora* (Fig. 9c) é a espécie que possui maior quantidade de camadas, de 5-6. Este tecido possui células de tamanhos indiferenciados em *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 8d); nas demais espécies, com exceção de *C. insignis* que é uniestratificada, as camadas próximas à epiderme possuem células de diâmetro menor que as camadas mais internas.

As células do tecido fundamental (Figs. 13c-13h) de todas as espécies são similares em forma e tamanho. O parênquima paliçádico é constituído por 1-9 camadas de células alongadas (Fig. 13f), com maior comprimento no eixo anticlinal e paredes periclinais curvas ou retas. Podem ocorrer gotículas lipídicas nessas células. *Clusia nemorosa* (Fig. 8c) possui uma única camada de células neste tecido. *Clusia criuva* (Fig. 6d), *C. gardneri* (Fig. 7b), *C. insignis* (Fig. 7d) e *C. parviflora* (Fig. 9c) apresentam cerca de 2 estratos celulares. *Clusia aemygdioi* (Fig. 6a), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. intermedia* (Figs. 8a e 8b), *C. lanceolata* (Fig. 9a), *C. marizii* (Fig. 9b) e *C. spiritusanctensis* (Fig. 8d) apresentam de 3-4 camadas celulares. *Clusia burchellii* (Fig. 10a) apresenta de 4-6 estratos celulares. *Clusia hilariana* (Fig. 7c) possui cerca de 6 camadas celulares e *C. fluminensis* (Fig. 7a) aproximadamente 9 estratos celulares. Nas espécies com duas ou mais camadas celulares, as células próximas à face adaxial são mais longas, em relação ao eixo anticlinal, que as células mais internas.

As células das camadas mais internas estabelecem uma transição entre o parênquima paliçádico e o lacunoso; nesta região existem nervuras de médio e pequeno porte (Fig. 14), compostas por feixes vasculares colaterais. Algumas nervuras de pequeno porte apresentam somente os elementos do xilema (Fig. 14b) – elementos de vaso (Fig. 15a), com espessamento de parede do tipo helicoidal (Fig. 15b) e reticulado (Fig. 15c), traqueídeos (Fig. 15d) e fibras libriformes (Fig. 15e). Os elementos condutores do floema são abundantes, este tecido é representado por elementos de tubo crivado, células companheiras, parênquima e fibras floemáticas, pode ocorrer idioblastos cristalíferos.

As nervuras de médio e pequeno porte apresentam-se revestidas por uma única bainha parenquimática, podendo conter cloroplastos em seu interior (Fig. 14c), além de calota esclerenquimática relacionada ao floema, voltada para a face abaxial (Fig. 14a). Em algumas nervuras de médio porte foi evidenciada bainha parenquimática com células de parede espessada, ou ainda, bainha esclerenquimática, como em *C. gardneri* (Fig. 14a) e *C. hilariana* (Fig. 11a).

O parênquima lacunoso está organizado em um número variável de camadas (12-30) entre as quais ocorrem espaços intercelulares de diâmetros distintos, as células têm forma que varia de bráquiforme (Fig. 13g) a isodiamétrica (Fig. 13h) e tamanhos diferentes, nas camadas mais próximas à epiderme há espessamento das paredes e

diminuição do lume celular (Figs. 9-12). Idioblastos isodiamétricos com drusas de oxalato de cálcio são constantes. *Clusia insignis* (Fig. 11b) apresenta a menor quantidade de células deste tecido, 12 camadas. *Clusia nemorosa* (Fig. 11c) possui cerca de 13 estratos celulares. *Clusia aemygdioi* (Fig. 9d), *C. arrudae* (Fig. 6b), *C. criuva* (Fig. 10b), *C. gardneri* (Fig. 10c), *C. intermedia* (Figs. 8a e 10d), *C. lanceolata* (Fig. 11d), *C. marizii* (Fig. 12a) e *C. parviflora* (Fig. 9c) apresentam de 15-17 camadas celulares neste tecido. *Clusia hilariana* (Fig. 11a) possui cerca de 18 camadas celulares, *C. burchellii* (Fig. 10a) tem de 20-26 estratos de células, *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 12b) possui de 25-27 e *C. fluminensis* (Fig. 12c) apresenta a maior quantidade de células neste tecido, cerca de 30; nessas espécies com maior quantidade de camadas celulares há poucos e pequenos espaços intercelulares.

A região da nervura principal é a que apresenta maior variabilidade entre as espécies (Figs. 16-19). Em *C. fluminensis* (Fig. 16a) e *C. lanceolata* (Fig. 16b) a região da nervura principal pode ser indiferenciada ou pouco mais espessa na face abaxial. Em *C. criuva* (Fig. 16c), *C. gardneri* (Fig. 16d), *C. marizii* (Fig. 17a) e *C. parviflora* (Fig. 17b) a seção é plano-convexa, a convexidade correspondendo à superfície abaxial. Em *C. aemygdioi* (Fig. 17c) há convexidades, em proporções semelhantes, para ambas as faces. Em *C. arrudae* (Fig. 17d), *C. insignis* (Fig. 18a) e *C. nemorosa* (Fig. 18b) há convexidades para ambas as faces, no entanto a da face abaxial é maior que a da adaxial. Em *C. burchellii* (Fig. 18c), *C. hilariana* (Fig. 18d) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 19a) existe convexidade com intensa projeção triangular para a face abaxial, sendo que em *C. spiritu-sanctensis* pode ocorrer leve concavidade na face adaxial. *Clusia intermedia* pode apresentar convexidade somente para a face abaxial (Fig. 19b) ou para ambas as faces, sendo a da face abaxial maior que a da adaxial (Fig. 19c).

A epiderme na face adaxial apresenta somente células epidérmicas comuns, menores e com paredes e cutícula mais espessas em relação aos demais trechos da lâmina foliar, há maior proporção de flanges entre as paredes anticlinais (Figs. 19d e 20a). Em *C. aemygdioi* e *C. insignis* (Fig. 19d) as células apresentam forma papilosa.

A epiderme em sua face abaxial (Fig. 20), na região da nervura principal, apresenta as mesmas características que na face adaxial, salvo a presença de raros estômatos. Algumas espécies podem apresentar células com forma papilosa, como ocorre em *C. aemygdioi*, *C. criuva* (Fig. 20c), *C. marizii* e *C. parviflora* (Fig. 20b).

Assim como no restante da lâmina foliar, *C. burchellii* é a única espécie que possui tecido subepidérmico esclerenquimático, composto por uma única camada de astroesclereídeos e esclereídeos raquiformes em ambas as faces (Figs. 20a e 20d).

A hipoderme, ao nível da nervura principal, mostra maior número de camadas (2-10) e células de lume menor, as demais características deste tecido são similares em relação aos demais trechos da lâmina foliar. *Clusia insignis* (Fig. 18a) possui de 2-3 camadas de células. *Clusia burchellii* (Fig. 18c), *C. gardneri* (Fig. 16d) e *C. nemorosa* (Fig. 18b) apresentam de 4-5 estratos de células. *Clusia criuva* (Fig. 16c), *C. fluminensis* (Fig. 16a), *C. hilariana* (Fig. 18d), *C. lanceolata* (Fig. 16b) e *C. marizii* (Fig. 17a) possuem de 6-7 camadas celulares. *Clusia aemygdioi* (Fig. 17c), *C. intermedia* (Figs. 19b e 19c), *C. parviflora* (Fig. 17b) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 19a) apresentam até 8 estratos celulares. *Clusia arrudae* (Fig. 17d) possui aproximadamente 10 camadas de células.

Logo a seguir são evidenciadas de 1-8 camadas de tecido clorenquimático com células de forma isodiamétrica e retangular. *Clusia criuva* (Fig. 16c) apresenta 1 camada de parênquima paliçádico parcialmente interrompido por células parenquimáticas isodiamétricas que seguem em mais 2 camadas, *C. marizii* (Fig. 17a) tem de 1-2 camadas de parênquima paliçádico seguidas por 3 de células isodiamétricas. As espécies que possuem parênquima paliçádico totalmente interrompido por células isodiamétricas são: *Clusia aemygdioi* (Fig. 17c) com 3 camadas; *C. burchellii* (Fig. 18c), *C. gardneri* (Fig. 16d) e *C. nemorosa* (Fig. 18b) de 4-5 camadas apresentando vários ductos de secreção; *C. arrudae* (Fig. 17d), *C. hilariana* (Fig. 18d) e *C. insignis* (Fig. 18a) com até 7 camadas; e *C. lanceolata* (Fig. 16b) com 3 camadas com células maiores e outras 3 com lume menor, estas circundando todo o cilindro vascular. As espécies que apresentam células retangulares interrompendo o parênquima paliçádico são: *C. intermedia* (Figs. 19b e 19c) de 2-3 camadas; *C. parviflora* (Fig. 17b) de 1-2 camadas de células com abundância em cloroplastos e outras 4 com células isodiamétricas e menor proporção de cloroplastos; *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 19a) com 3 camadas e outras 3 com células isodiamétricas e *C. fluminensis* (Fig. 16a) com cerca de 8 camadas celulares.

O sistema vascular da nervura principal apresenta-se composto de 12-27 feixes colaterais dispostos em forma de círculo a elipse, podendo estar separados por células

parenquimáticas isodiamétricas ou por parênquima radial, cujas paredes são espessas e lignificadas (Fig. 21). Cada feixe está acompanhado por uma calota de fibras e esclereídeos, localizados na região do floema (Fig. 21a), estas calotas podem se unir formando uma bainha esclerenquimática de várias camadas circundando o cilindro vascular (Fig. 21b). Na região perivascular ocorrem células parenquimáticas contendo grãos de amido de forma ovóide e tamanhos variados, formando uma bainha amilífera.

O floema é abundante (Fig. 21), representado por elementos de tubo crivado, células companheiras e parênquima floemático, podendo ocorrer idioblastos cristalíferos.

O xilema é constituído por fileiras simples, às vezes duplas, de 3-6 elementos de proto e metaxilema, aquele freqüentemente obliterado (Fig. 21e). As fibras xilemáticas são pouco numerosas e o parênquima radial exhibe comumente células esclerificadas, entre as quais ocorrem idioblastos cristalíferos. Em alguns feixes observa-se o início de atividade cambial (Fig. 21e). Os elementos condutores encontrados são elementos de vaso (Fig. 15a) de diferentes comprimentos com espessamentos do tipo helicoidal (Fig. 15b) e reticulado (Fig. 15c). Também foram encontrados raros traqueídeos (Fig. 15d) e fibras libriformes (Fig. 15e).

Na região da medula evidenciam-se ductos secretores e 5-10 feixes vasculares dispostos em faixa, com região do floema voltada para face abaxial, imersos em células parenquimáticas isodiamétricas de paredes diversamente espessadas (Figs. 21a, 21c e 21d). A medula é mais abundante, em relação ao número de células parenquimáticas, entre os feixes internos e os externos voltados para a face abaxial. Em *C. arrudae* e *C. gardneri* (Fig. 21c) existem 2 fileiras de feixes vasculares na medula.

Observam-se dois feixes laterais que estão se desprendendo do arco vascular, também são acompanhados de calota de fibras e esclereídeos, e bainha amilífera (Figs. 16-19). Em todas as espécies encontram-se esclereídeos bifurcados (Fig. 13c), osteoesclereídeos (Fig. 13d) e esclereídeos colunares (Fig. 13e) e, somente em *C. burchellii* foram encontrados esclereídeos raquiformes (Fig. 13a) e astroesclereídeos (Fig. 13b).

Ocorrem de 7-32 camadas de parênquima com células de forma isodiamétrica e diâmetros variáveis, podendo conter cloroplastos, sendo que em direção à face abaxial, as paredes se tornam mais espessas e o lume menor. *Clusia nemorosa* (Fig. 18b) tem



aproximadamente 7 camadas celulares. *Clusia insignis* (Fig. 18a) possui de 9-10 camadas de células. Em *C. aemygdioi* (Fig. 17c), *C. criuva* (Fig. 16c), *C. intermedia* (Figs. 19b e 19c) e *C. lanceolata* (Fig. 16b) há 11 estratos de células. Em *C. parviflora* (Fig. 17b) há cerca de 13 estratos celulares. *Clusia gardneri* (Fig. 16d) apresenta cerca de 15 camadas celulares. *Clusia arrudae* (Fig. 17d) e *C. marizii* (Fig. 17a) possuem cerca de 16 estratos celulares. *Clusia fluminensis* (Fig. 16a) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 19a) têm cerca de 22 camadas de células. *Clusia burchellii* (Fig. 18c) tem aproximadamente 25 camadas celulares e *C. hilariana* (Fig. 18d) apresenta a maior quantidade de camadas celulares, 32. Abundância de ductos e idioblastos cristalíferos, principalmente com a proximidade da epiderme em face abaxial.

Seguem aproximadamente de 1-5 camadas de colênquima angular, com células isodiamétricas. *Clusia aemygdioi* (Fig. 17c), *C. insignis* (Fig. 18a) e *C. lanceolata* (Fig. 16b) possuem de 1-2 camadas de células. Em *C. criuva* (Figs. 16c e 20c), *C. intermedia* (Figs. 19b e 19c), *C. marizii* (Fig. 17a) e *C. parviflora* (Figs. 17b e 20b) há de 2-4 camadas celulares. *Clusia arrudae* (Fig. 17d), *C. fluminensis* (Fig. 16a), *C. gardneri* (Fig. 16d) e *C. nemorosa* (Fig. 18b) têm aproximadamente 4 camadas de células. *Clusia burchellii* (Fig. 18c e 20d), *C. hilariana* (Fig. 18d) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 19a) possuem cerca de 5 estratos celulares. Abundância de ductos e idioblastos cristalíferos.

Das três espécies cujas amostras de ambos os sexos estavam disponíveis, somente *C. intermedia* apresentou dimorfismo sexual. A lâmina foliar do indivíduo masculino (Fig. 8a) é mais espessa que a do feminino (Fig. 8b) devido à maior quantidade de camadas celulares no mesofilo; na região da nervura principal o indivíduo masculino apresenta convexidade somente para a face abaxial (Fig. 19b), enquanto o feminino apresenta para ambas as faces, sendo a da face abaxial maior que a da adaxial (Fig. 19c).

De acordo com as diferenças observadas entre as espécies, em nível anatômico, foi possível construir a seguinte chave para a identificação das mesmas.

1-Lâmina foliar composta por até 20 camadas celulares no mesofilo.....	2
1'-Lâmina foliar composta por 21-29 camadas celulares no mesofilo.....	4
1''-Lâmina foliar composta por 30 ou mais camadas celulares no mesofilo.....	8
2-Nervura principal convexa apenas na face abaxial.....	<i>C. gardneri</i>
2'-Nervura principal convexa em ambas as faces, sendo na abaxial maior que na adaxial.....	3
3- Presença de câmara subestomática.....	<i>C. nemorosa</i>
3'- Câmara subestomática discreta ou ausente.....	<i>C. insignis</i>
4-Nervura principal indiferenciada do restante da lâmina foliar.....	<i>C. lanceolata</i>
4'-Nervura principal convexa apenas na face abaxial.....	5
4''-Nervura principal convexa em ambas as faces.....	6
5-Cutícula com ornamentação e célula comum quadrada na face adaxial da epiderme.....	<i>C. intermedia</i>
5'-Cutícula com ornamentação e célula comum retangular na face adaxial da epiderme.....	<i>C. marizii</i>
5''-Cutícula lisa e célula comum quadrada na face adaxial da epiderme.....	<i>C. criuva</i>
5'''-Cutícula lisa e célula comum retangular na face adaxial da epiderme.....	<i>C. parviflora</i>
6-Convexidades semelhantes em ambas as faces.....	<i>C. aemygdioi</i>
6'-Convexidade na face abaxial maior que na adaxial.....	7
7-Parênquima paliádico totalmente interrompido na região da nervura principal.....	<i>C. arrudae</i>
7'-Parênquima paliádico parcialmente interrompido na região da nervura principal.....	<i>C. intermedia</i>
8-Nervura principal convexa apenas na face abaxial.....	9
8'-Nervura principal indiferenciada do restante da lâmina foliar.....	<i>C. fluminensis</i>
9- Presença de câmara subestomática.....	<i>C. spiritu-sanctensis</i>
9'-Câmara subestomática discreta ou ausente.....	10
10- Presença de tecido esclerenquimático subepidérmico.....	<i>C. burchellii</i>
10'-Ausência de tecido esclerenquimático subepidérmico.....	<i>C. hilariana</i>

## Resultados - Histoquímica da Lâmina Foliar

Os testes histoquímicos foram realizados nas espécies *Clusia burchellii* (Tab. 2), *C. criuva* (Tab. 3), *C. fluminensis* (Tab. 4), *C. gardneri* (Tab. 5), *C. insignis* (Tab. 6), *C. lanceolata* (Tab. 7) e *C. nemorosa* (Tab. 8). Para as demais espécies não foi realizada esta análise porque as amostras já foram enviadas fixadas e preservadas em etanol 70%, não havendo material fresco.

A presença de celulose foi confirmada principalmente com o reagente específico azul de metileno. Em todas as espécies estudadas, só não foi detectada celulose na cutícula (Figs. 22a e 22b) e nas fibras dos elementos condutores (Fig. 22c).

Os compostos lipofílicos - cutina, suberina e outros – além da mucilagem foram detectados, em todas as espécies, com resultados semelhantes; as principais estruturas que apresentaram reação positiva para estes compostos foram: cutícula (Fig. 22d), os tecidos parenquimáticos, principalmente o paliçádico (Figs. 22d e 22e), os elementos de vaso e floema (Fig. 22f) e o interior dos ductos secretores (Fig. 23a). Sendo que o teste com sudan IV também mostrou reação positiva para os compostos lipofílicos presentes no látex no parênquima paliçádico (Fig. 23b), nos elementos condutores (Fig. 22f) e no interior dos ductos secretores (Fig. 23a).

A cutícula é espessa em ambas as faces, com maior impregnação de compostos lipofílicos, como cera, na face adaxial. Foram encontradas gotículas de lipídios em células isoladas dos tecidos parenquimáticos.

Foram detectados açúcares redutores no parênquima paliçádico (Fig. 23c), em menor quantidade na epiderme (Fig. 23c), no parênquima lacunoso próximo à face abaxial (Fig. 23c) e nos elementos condutores do tecido floemático (Fig. 23d). Nas espécies *Clusia burchellii*, *C. insignis* (Fig. 23c) e *C. nemorosa* (Fig. 23d) ocorreu reação positiva para esses açúcares em todas as estruturas mencionadas acima; *C. criuva*, *C. gardneri* (Figs. 23e e 23f), *C. fluminensis* (Fig. 24a) e *C. lanceolata* apresentaram reação apenas na epiderme.

Grãos de amido foram evidenciados em todos os testes específicos aplicados e em todas as espécies, principalmente ao redor do cilindro vascular da nervura principal – bainha amilífera (Fig. 24b), no tecido parenquimático próximo à face abaxial na região da nervura principal (Fig. 24c) e no tecido parenquimático circundante aos elementos condutores (Fig. 24d).

Os cristais presentes na lâmina foliar de todas as espécies estudadas são compostos de oxalato de cálcio (Fig. 23e), confirmado pela reação positiva em ácido sulfúrico e negativa em ácido acético 70%.

Os compostos fenólicos foram observados, com os testes dicromato de potássio e sulfato ferroso aquoso com formalina, nos tecidos parenquimáticos, principalmente o paliçádico (Fig. 24e), epiderme (Figs. 24e e 24f) e elementos condutores, principalmente o floema (Fig. 25a), para as 7 espécies estudadas. A observação a partir dos testes realizados com os fluorocromos acetato neutro de chumbo aquoso e

cloreto de alumínio aquoso não foi possível porque as secções, sem a utilização de qualquer reagente, já emitiam fluorescência.

Os taninos foram observados em praticamente todas as células dos tecidos parenquimáticos e elementos condutores, apresentando maior proporção que os demais metabólitos secundários detectados (Fig. 25b). Foram realizados dois testes para detecção destes compostos – sulfato de ferro e vanilina clorídrica, no entanto somente o primeiro mostrou reação positiva.

As nervações foliares das espécies analisadas são ricas em lignina, detectada nas fibras ao redor dos feixes vasculares e nos elementos de vaso (Figs. 25c, 25d e 26a), em *C. burchellii* também houve detecção de lignina nos tecidos esclerenquimáticos subepidérmicos de ambas as faces (Fig. 26b).

As paredes celulares apresentam-se impregnadas por pectina. A reação ocorreu em praticamente toda a lâmina foliar, com exceção da cutícula (Fig. 26c) e fibras ao redor dos feixes vasculares (Fig. 26d); não houve diferenças entre as espécies.

Não foram encontrados os precipitados característicos de resinas após sete dias de imersão das secções em acetato cúprico aquoso 7%. Também não foram observadas reações indicativas da presença de alcalóides, proteínas e sílica em nenhum dos testes realizados.

**Tab. 2.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia burchellii* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr	
		Cut	Ep	Esc	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR			Col
açúcar redutor	Fehling	-	++	-	-	++	-	++	++	-	+	+	-	++	++	-	+	-	-	-	-
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	lugol	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
Carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++
	cloreto zinco iodado	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++
	Steinmetz	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++
Fenóis	dicromato potássio	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	+
	sulfato ferro formalina	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	+
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
	floroglucinol clorídrico	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
	Steinmetz	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
	sulfato anilina	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
Lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	-
	sudan III	++	+	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	-
	sudan IV	++	+	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	-
oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Pectina	vermelho rutênio	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Proteína	ácido picrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	cristal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Esclerênquima (Esc), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

**Tab. 3.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia criuva* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP								Dc	Cr		
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col					
açúcar redutor	Fehling	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	
	lugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	
Carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
Lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	
oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
Proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Sílica	crystal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

**Tab. 4.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia fluminensis* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr				
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col						
Açúcar redutor	Fehling	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
	lugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	cristal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

**Tab. 5.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia gardneri* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr				
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col						
Açúcar redutor	Fehling	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
	lugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	cristal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).



**Tab. 6.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia insignis* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col		
Açúcar redutor	Fehling	-	++	-	++	-	++	++	-	+	+	-	-	++	++	-	+	-	-	-
alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	lugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
Oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	cristal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

**Tab. 7.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia lanceolata* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr				
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col						
açúcar redutor	Fehling	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
	Iugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
Carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-
oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	cristal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

**Tab. 8.** Localização dos compostos detectados na lâmina foliar de *Clusia nemorosa* através de testes histoquímicos.

Composto	Reagente	LF										NP							Dc	Cr
		Cut	Ep	Hip	PP	BF	Xil	Flo	Fib	PL	Clo	BA	Fib	Flo	Xil	Md	PR	Col		
açúcar redutor	Fehling	-	++	-	++	-	++	++	-	+	+	-	-	++	++	-	+	-	-	-
Alcalóide	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ellran	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	cloreto zinco iodado	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	lugol	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	
carbonato cálcio	ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Celulose	azul metileno	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	cloreto zinco iodado	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
	Steinmetz	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	
Fenóis	dicromato potássio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	
	sulfato ferro formalina	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	
Lignina	cloreto zinco iodado	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	
	floroglucinol clorídrico	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	
	Steinmetz	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	
	sulfato anilina	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	
Lipofílicos	Steinmetz	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
	sudan III	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
	sudan IV	++	+	+	++	+	+	++	-	+	+	-	++	+	+	+	+	+	++	
oxalato cálcio	ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
Pectina	vermelho rutênio	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	
Proteína	ácido pícrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	azul Coomassie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ferrocianeto potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Resina	acetato cúprico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sílica	crystal fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanino	sulfato ferro	-	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	
	vanilina clorídrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

NOTAS: - reação negativa para o composto

+ reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana

++ reação em toda a estrutura e/ou com intensidade forte

Legenda: Lâmina foliar (LF), Nervura principal (NP), Ductos (Dc), Cristais (Cr), Cutícula (Cut), Epiderme (Ep), Hipoderme (Hip), Parênquima Paliçádico (PP), Bainha de Feixe (BF), Xilema (Xil), Floema (Flo), Fibras (Fib), Parênquima Lacunoso (PL), Clorênquima (Clo), Bainha Amilífera (BA), Medula (Md), Parênquima de Preenchimento (PR), Colênquima (Col).

## Discussão e Conclusão

Existem duas principais funções para a venação foliar: transporte através dos tecidos condutores e estabilização mecânica devido à presença de elementos esclerificados. Estas características da venação foliar são, geralmente, geneticamente fixados, podendo servir como ferramenta taxonômica para a identificação de espécies (Roth-Nebelsick *et al.*, 2001), além de prover informações adicionais para propor hipóteses de relações filogenéticas entre espécies ou variedades (Lis, 1992).

Confirmando dados obtidos por Machado (1980) para *Clusia lanceolata*, o padrão de venação das espécies analisadas é do tipo pinado–camptódromo–broquidódromo. De acordo com a padronização sugerida por Hickey (1974 e 1979), as espécies apresentam nervuras de até quatro ordens, pois as venações mais finas formam um retículo relativamente uniforme que não permite diferenciação de calibre entre as mesmas.

As espécies estudadas possuem alguns padrões de venação distintos, o que não é suficiente para a identificação das mesmas, mas torna possível a separação em grupos, o que pode ser utilizado, quando associado a outros caracteres, no reconhecimento das mesmas quando em estágio vegetativo. Os caracteres mais confiáveis para a distinção entre as espécies são: ângulo e forma do ápice, ângulo das nervuras secundárias (principalmente quando comparado o ápice com o restante da lâmina foliar), posição da veia última marginal e presença de invaginação desta veia na região da nervura principal.

Em relação ao ápice, o ângulo é agudo em *C. criuva*, *C. insignis* e *C. nemorosa*. *Clusia criuva* apresenta forma arredondada do ápice, enquanto *C. insignis* e *C. nemorosa* têm forma retusa. Ainda em relação à região apical, *C. insignis* possui redução nos ângulos agudos das nervuras secundárias; em *C. criuva* os ângulos são quase retos, e no ápice há redução angular; em *C. nemorosa* os ângulos são agudos amplos. Essas três espécies apresentam veia última marginal em posição periférica, sendo que em *C. criuva* e *C. nemorosa* existe invaginação desta veia na região da nervura primária.

O ápice é obtuso em *C. burchellii*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. hilariana* e *C. lanceolata*. A forma do ápice é arredondada nas duas primeiras e retusa nas demais.

Em *C. burchellii* os ângulos são agudos amplos a retos, exceto no ápice onde se tornam obtusos. Em *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. lanceolata* e *C. hilariana* o ápice apresenta ângulos agudos das nervuras secundárias mais reduzidos. As espécies *C. burchellii*, *C. fluminensis* e *C. lanceolata* têm invaginação na veia última marginal na área de contato com a nervura primária.

Quanto à anatomia foliar, as espécies estudadas possuem características semelhantes às observadas por Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1983), verifica-se que encontram-se perfeitamente situadas no quadro de caracteres gerais da família: dorsiventralidade do mesofilo, cutícula espessa, estômatos restritos à face abaxial, hipoderme apenas na face adaxial em uma ou várias camadas, cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa geralmente presentes e ductos secretores de ampla ocorrência.

Machado (1980) observou em *Clusia lanceolata* Cambess. var. *lanceolata* e *Clusia lanceolata* var. *oblongifolia* Engler as características anatômicas gerais das Clusiaceae, como folhas hipoestomáticas, cutícula espessa e mesofilo heterogêneo contendo ductos secretores. Embora tenha verificado uma acentuada uniformidade estrutural nessas duas variedades, a autora ressalta algumas diferenças na quantidade de camadas celulares, provavelmente em decorrência dos fatores ambientais.

As espécies aqui estudadas também possuem acentuada uniformidade em nível anatômico, no que se refere aos aspectos gerais da lâmina foliar, como tipo e disposição dos tecidos presentes.

As espécies analisadas apresentam cutícula espessa, o que as tornam resistentes a períodos de seca ou baixa precipitação, principalmente para aquelas oriundas do Cerrado. De acordo com Helbsing *et al.* (2000), sob severas condições ambientais, como deficiência hídrica e altas temperaturas, os estômatos freqüentemente se fecharão, e a sobrevivência do vegetal pode então depender fortemente das perdas de quantidades residuais de água, determinadas, em diferentes níveis, pelas taxas de transpiração cuticular. Esau (1974) afirma que a cutícula, assim como as camadas cutinizadas e a cera superficial, desempenham relevante papel na redução da perda de água.

Não foram evidenciados tricomas nas espécies analisadas, corroborando os dados de Solereder (1908) que relatou ausência de pêlos na família. No entanto, Metcalfe & Chalk (1983) afirmaram que os tricomas são raros entre os representantes

de Clusiaceae e, Morretes & Ferri (1972) observaram pontos de inserção de tricomas na face abaxial da epiderme de *Clusia spathulaefolia*.

Boeger *et al.* (1997) fizeram a análise anatômica de *C. criuva* e concluíram que a mesma apresenta epiderme da face adaxial pluriestratificada com paredes anticlinais externas recobertas por uma espessa cutícula. No entanto, na face adaxial das folhas das espécies estudadas, evidenciaram-se vários estratos cujas células diferem daquelas da epiderme, quer pela forma, quer pelo aspecto e espessura das paredes. Embora não tenham sido desenvolvidos estudos ontogenéticos, foi possível observar em folhas muito jovens, que esses estratos celulares se originam pela divisão periclinal das células subepidérmicas. Tal fato sugere que as camadas subepidérmicas ocorrentes nas espécies em estudo constituem uma autêntica hipoderme.

Esau (1974) menciona que células hipodérmicas podem ser aclorofiladas ou portadoras de poucos cloroplastos, e Metcalfe (1983), ao tecer considerações sobre a origem e as características das células hipodérmicas, faz menção a 3 tipos especiais de hipoderme: colenquimatosa, esponjosa e esclerótica, e acrescenta que estas variantes podem ser úteis na taxonomia. A hipoderme, em todas as espécies analisadas, é de natureza colenquimatosa, sendo nela observados ductos secretores esquizógenos e idioblastos cristalíferos encerrando drusas de oxalato de cálcio.

Wylie (1949) refere que a hipoderme pode estar presente em um grande número de xerófitas, como tecido armazenador de água, auxiliando na translocação extravascular da folha, sendo que as paredes de suas células podem variar em espessura.

*Clusia insignis*, oriunda da Floresta Amazônica, apresenta somente uma camada de células na hipoderme, resultado que corrobora a função deste tecido. Uma vez que nesta região geográfica não ocorrem longas secas, não se fazendo necessária a presença de um tecido armazenador de água. Enquanto que nas espécies do Cerrado este tecido apresenta até 5 camadas celulares, o que sugere uma adaptação aos períodos de baixa precipitação.

Cutter (1986a) cita que as células da hipoderme geralmente apresentam paredes delgadas. Nas espécies estudadas neste trabalho, a hipoderme possui células de paredes espessas e impregnadas por substâncias pécticas, confirmando dados de Solereder (1908) que mencionou a tendência à esclerificação ou ao espessamento das

paredes celulares na hipoderme foliar das espécies desta família. Este espessamento pode estar relacionado, além do armazenamento de substâncias, à sustentação da folha.

Machado (1980) faz menção à presença de uma hipoderme na face adaxial das folhas de *C. lanceolata*, constituída por células incolores, em 3-4 camadas contendo ductos secretores esquizógenos e drusas de oxalato de cálcio. Estes resultados também foram encontrados neste trabalho para a mesma espécie.

O mesofilo de *C. criuva* é caracterizado por aproximadamente 2 camadas de parênquima paliçádico e 16 de parênquima lacunoso. Boeger *et al.* (1997) realizaram a análise anatômica da mesma espécie e concluíram que o parênquima paliçádico é constituído por uma camada de células e o lacunoso por até 12 camadas. Esta divergência entre o resultado encontrado e o observado pelos demais autores pode-se tratar de plasticidade fenotípica devido a mudanças no ambiente onde o vegetal se encontra, como ocorreu entre as variedades de *C. lanceolata* analisadas por Machado (1980).

A origem esquizógena dos ductos das Gutiferae foi referida por Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk, (1983). Paula (1966) menciona a origem esquizógena dos ductos secretores de *Clusia grandiflora* e a origem esquizolisígena para os canais de *Clusia* aff. *macropoda*. Machado (1980), por sua vez, considera que os canais secretores de *Clusia lanceolata* são esquizógenos e esquizolisígenos.

Embora não tenham sido realizados estudos ontogenéticos com relação aos ductos secretores das espécies analisadas, pôde-se evidenciar que na planta adulta eles se apresentam bem delimitados pelas células epiteliais, sem qualquer vestígio de lise, sugerindo a hipótese da origem esquizógena e, confirmando resultados de Curtis & Lersten (1990) para espécies de *Hypericum* (Clusiaceae).

Os ductos secretores que ocorrem nas espécies estudadas se encontram circundados por células epiteliais bem demarcadas, de número variável. Estes ductos estão dispersos ao longo do mesofilo e, com maior concentração, na região da nervura principal. *Clusia fluminensis* é a única espécie que se destaca das demais devido ao maior diâmetro e abundância dos ductos secretores. Solereder (1908) frisa que a distribuição desses ductos pode ser útil para a diagnose de gêneros e espécies na família, sendo que os ductos secretores de *Clusia* podem percorrer o mesofilo

independentemente das nervuras ou estar a elas relacionados; menciona ainda, sua ocorrência na hipoderme e mais raramente no parênquima dos feixes vasculares em *Clusia eugenioides*, *C. flava*, *C. minor* e *C. pana-panari*. Esta localização também foi observada em todas as espécies analisadas.

Nas espécies analisadas foram evidenciados esclereídeos, geralmente junto aos feixes vasculares e, muito raramente, difusos no parênquima da nervura principal. Via de regra são curtos, nas formas de esclereídeos colunares, osteoesclereídeos e esclereídeos bifurcados e, somente em *C. burchellii* foram encontrados astroesclereídeos e esclereídeos raquiformes, o que pode ser utilizado para separar esta espécie das demais.

Os esclereídeos são interpretados como estruturas relacionadas à função mecânica ou de suporte (Eames & MacDaniels, 1947; Esau, 1974; Cutter, 1986a e Fahn, 1982), podendo ser utilizados como subsídios em taxonomia (Carlquist, 1961) e se diferenciar junto aos traqueídeos das terminações vasculares (Esau, 1974). Paula (1966 e 1976) relata a ocorrência de esclereídeos nas folhas de *Clusia grandiflora* Splitg. e *Clusia* aff. *macropoda* Klotzsch., respectivamente. Morretes & Ferri (1972) também citam a presença desses elementos no parênquima lacunoso de *Clusia spathulaefolia* Engl. Como os esclereídeos foram observados em diversas espécies do gênero em diferentes ambientes, pode-se deduzir que é uma característica filogenética e, conseqüentemente, útil na taxonomia.

Em relação às células condutoras do xilema, foram observados muitos elementos de vaso, de tamanhos e espessamentos de parede distintos, entretanto a quantidade de traqueídeos foi muito inferior quando comparada a dos elementos de vaso, sugerindo maior especialização das células para o transporte. Paula (1974a) também constatou que os traqueídeos eram escassos ou ausentes na madeira de diferentes espécies deste gênero.

A literatura revela que as espécies do gênero *Clusia* manifestam relativa constância no tocante ao sistema vascular da lâmina foliar (Paula, 1966; Machado, 1980; Sobrado & Medina, 1980 e Schneider, 1985). As pequenas variações referentes à quantidade de células nos tecidos condutores, mencionadas por Machado (1980), não invalidam tal assertiva. O comportamento do sistema vascular das lâminas foliares das espécies estudadas, como a disposição dos tecidos condutores, também se



assemelha ao que tem sido referido para os demais representantes do gênero, sendo que as principais diferenças observadas foram a forma do cilindro vascular, variando de circular a elíptica, a possível separação dos feixes vasculares por tecido parenquimático e a espessura nas paredes das células da medula.

Stace (1965) ressalta que normalmente os estômatos não ocorrem na epiderme da nervura principal e quando isto acontece, não são funcionais. Nas espécies estudadas, os estômatos também são observados na epiderme da nervura principal. Entretanto, embora não tenham sido desenvolvidos experimentos para testar sua funcionalidade, nada indica o contrário.

De acordo com Schreiber & Riederer (1996) as plantas sempre verdes com características escleromórficas, como epiderme com células altas e recoberta por espessa cutícula, estão adaptadas à sobrevivência em períodos de seca, quando a elevada evaporação de água deve ser evitada, caracterizando a baixa taxa de permeabilidade hídrica desses organismos.

As espécies estudadas são sempre verdes e apresentam algumas características xéricas como cutícula e camadas cuticulares espessas, esclerênquima abundante e parênquima paliçádico em várias camadas. Até o momento, os estudos realizados sobre as espécies do gênero *Clusia* não abordam os caracteres edáficos dos respectivos ambientes, o que torna desaconselhável levantar quaisquer hipóteses sobre as possíveis causas determinantes do aparecimento das características escleromórficas das espécies aqui estudadas.

As substâncias secretadas pelas plantas têm merecido atenção de vários pesquisadores que têm procurado elucidar sua natureza química e o que elas representam para o vegetal (Pyykkö, 1966; Metcalfe, 1983; Fahn, 1988 e 2000; Oliveira *et al.*, 1996; González *et al.*, 1997 e Nogueira *et al.*, 2001), sendo que Metcalfe (1983) ressalta que algumas dessas substâncias fornecem subsídios para estudos taxonômicos.

Para a qualificação de compostos de interesse nos tecidos vegetais podem ser usados métodos de coloração histoquímica com controles adequados e, sempre que possível, dois procedimentos devem ser utilizados para a qualificação da mesma substância (Jensen, 1962). Isto ocorre porque os testes usados para reconhecimento

de metabólitos celulares, em geral, não apresentam especificidade para apenas uma substância (Kraus & Arduin, 1997).

Os compostos químicos das plantas estão didaticamente divididos em compostos originários do metabolismo primário ou do secundário; o metabolismo primário envolve os metabólitos ou macromoléculas essenciais, com funções vitais bem definidas: lipídios, protídeos, glicídeos (Poser & Mentz, 2001). Herrmann & Weaver (1999) e Poser & Mentz (2001) explicam que os produtos do metabolismo secundário são ligados através de diversas rotas de biossíntese aos do metabolismo primário.

Os metabólitos secundários são usados principalmente como auto-proteção contra ataques microbianos, herbivoria e radiação UV ou na interação benéfica com outros organismos, como polinização de flores, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos taxonômicos (Poser & Mentz, 2001 e Endt *et al.*, 2002).

Os metabólitos primários encontrados foram os açúcares redutores, os grãos de amido e os compostos lipofílicos. De acordo com Fahn (1988), dentre os materiais lipofílicos secretados pelas plantas estão os terpenos, lipídios, ceras e flavonoides, sendo que resinas e óleos essenciais também possuem grande variedade de terpenos. Já os metabólitos secundários evidenciados foram os cristais e os compostos fenólicos, dentre eles, lignina e tanino.

Em relação aos tecidos secretores, Fahn (1982, 1988, 2000) afirmou que os mesmos são usualmente classificados de acordo com as substâncias produzidas, mas como o mesmo tecido pode produzir um número diferente de substâncias, a classificação torna-se complexa. Segundo Esau (1974), em Clusiaceae ocorrem grandes e abundantes células parenquimáticas secretoras nos tecidos vasculares e fundamental da folha, mas com conteúdos não especificados. Com os testes realizados, foram detectados, nos tecidos vasculares e parenquimáticos, açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos e lipofílicos, sendo que no parênquima paliádico também foram detectados compostos lipofílicos do látex.

Em todas as espécies a cutícula apresenta-se espessa e com impregnação de cera e outros compostos lipofílicos, o que acarreta maior proteção à dessecação. Corroborando informações de Esau (1974) sobre a redução da perda de água realizada pela cutícula, camadas cutinizadas e a cera superficial. Cutter (1986a) relata que a

composição química da cutícula e dos estratos cutinizados é variável, no que diz respeito à proporção de cutina e de cera nas diferentes camadas.

Os açúcares redutores apresentaram localizações distintas entre as espécies, estando presentes no parênquima paliçádico, no parênquima lacunoso próximo à face abaxial, no tecido floemático e em menor quantidade na epiderme. Nas espécies *C. criuva*, *C. gardneri*, *C. fluminensis* e *C. lanceolata* houve reação apenas na epiderme. Koroleva *et al.* (1997) afirmaram que a epiderme de folhas de gramíneas pode funcionar como um compartimento reserva de açúcares, podendo abranger 5-15% de glicose e frutose foliares.

As espécies aqui estudadas apresentam hipoderme com paredes ricas em pectina e conteúdo citoplasmático portador de compostos lipofílicos, taninos e outros compostos fenólicos. Os compostos armazenados por este tecido estão de acordo com Eames & MacDaniels (1947); no entanto, a composição das paredes diverge, esses autores associam a ocorrência de hipoderme a fatores ambientais e referem que a mesma pode ser de natureza cutinizada ou mais comumente lignificada.

Entre as substâncias armazenadas e/ou secretadas pelas plantas os compostos fenólicos, principalmente os taninos, são muito freqüentes nas xerófitas (Pyykkö, 1966). Pyykkö (1966), Esau (1974) e Fahn (1988 e 2000) mencionaram a possibilidade das substâncias tânicas estarem relacionadas com a proteção contra dessecação, apodrecimento e ataque por fungos e bactérias. Montenegro *et al.* (1980) e Levin (1971) citaram que os taninos podem inibir o ataque dos insetos, reduzindo o valor nutritivo das folhas e alterando seu paladar. Cooper-Driver & Bhattacharya (1998) afirmaram que vários compostos fenólicos são utilizados na medicina como antioxidantes e no tratamento de câncer e doenças cardíacas.

Cutter (1986b) enfatiza que, além dos compostos fenólicos, a cutícula também é extremamente resistente ao ataque de microorganismos, reduzindo a permeabilidade da epiderme e tomando parte efetiva na proteção da planta contra esses agentes externos.

Confirmando dados de Paula (1966), Machado (1980) e Schneider (1985) sobre a presença de taninos nas espécies por eles estudadas, as espécies deste trabalho portam grande quantidade de taninos, em quase todos os tecidos da lâmina foliar. No entanto, a presença de depósitos de cera, somados à cutícula e aos compostos

fenólicos não apresentaram uma barreira efetiva contra a penetração dos fungos através das células epidérmicas, o que foi observado no campo e sob microscopia óptica.

Haberlandt (1928) focaliza a ocorrência de células secretoras de resinas nas Clusiaceae. Carmo *et al.* (2002) fazem referência à importância da resina das flores feminina e masculina de *Clusia arrudae*, apesar de não terem realizado estudos histoquímicos para a confirmação deste composto. No entanto, no estudo aqui realizado, não foram encontrados os precipitados característicos de resinas após sete dias de imersão das secções em acetato cúprico aquoso 7%, confirmando dados de Curtis & Lersten (1990), que também não encontraram resinas em algumas espécies da família.

Dentre as estruturas secretoras, os ductos e cavidades constituem um dos aspectos mais abordados (Solereeder, 1908; Metcalfe, 1983; Fahn, 1988 e 2000). Os ductos secretores das espécies estudadas apresentam compostos lipofílicos no seu interior. No entanto, Curtis & Lersten (1990) evidenciaram pouco ou nenhum conteúdo de óleo nos ductos de duas espécies de *Hypericum* (Clusiaceae). Já Metcalfe & Chalk (1983) referem que o fluido contido no interior dos ductos secretores de *Clusia* e de outros gêneros da família tem aspecto leitoso e é semelhante ao látex.

Além de estruturas secretoras, também foram observados cristais sob a forma de drusas, cuja composição é oxalato de cálcio, ocorrendo em maior frequência no mesofilo. Trabalhos anteriores relatam a ocorrência deste tipo de cristal em *Clusia* (Solereeder, 1908; Machado, 1980 e Metcalfe & Chalk, 1983).

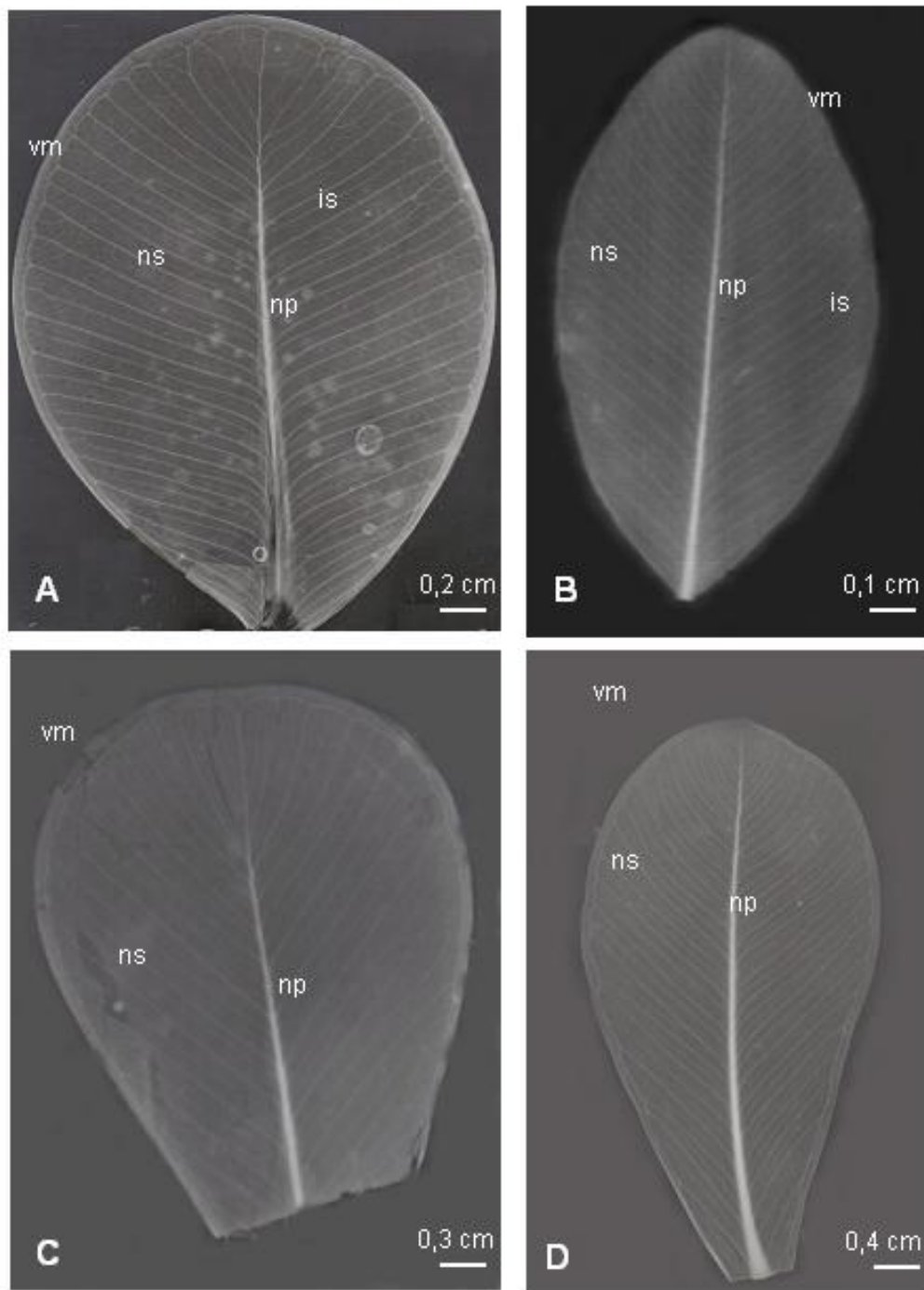
Segundo Pyykkö (1966) a ocorrência de cristais nas folhas é um caráter exclusivo em nível de família ou gênero, não havendo relação com o ambiente. Quando em proporções acima do normal, pode refletir algumas vezes, uma resposta a condições patológicas (Metcalfe & Chalk, 1983).

De acordo com Fahn (1982) muitas plantas possuem em suas células depósitos de excreção constituídos de matéria inorgânica, na maioria das vezes, sais de cálcio formando os cristais. Conforme Prychid & Rudall (1999), os cristais, além de importância taxonômica, podem representar formas de armazenamento de cálcio e ácido oxálico, e também serem depósitos de substâncias de metabolismo secundário. Finley (1999) mencionou a importância dos cristais como defesa contra herbivoria, que

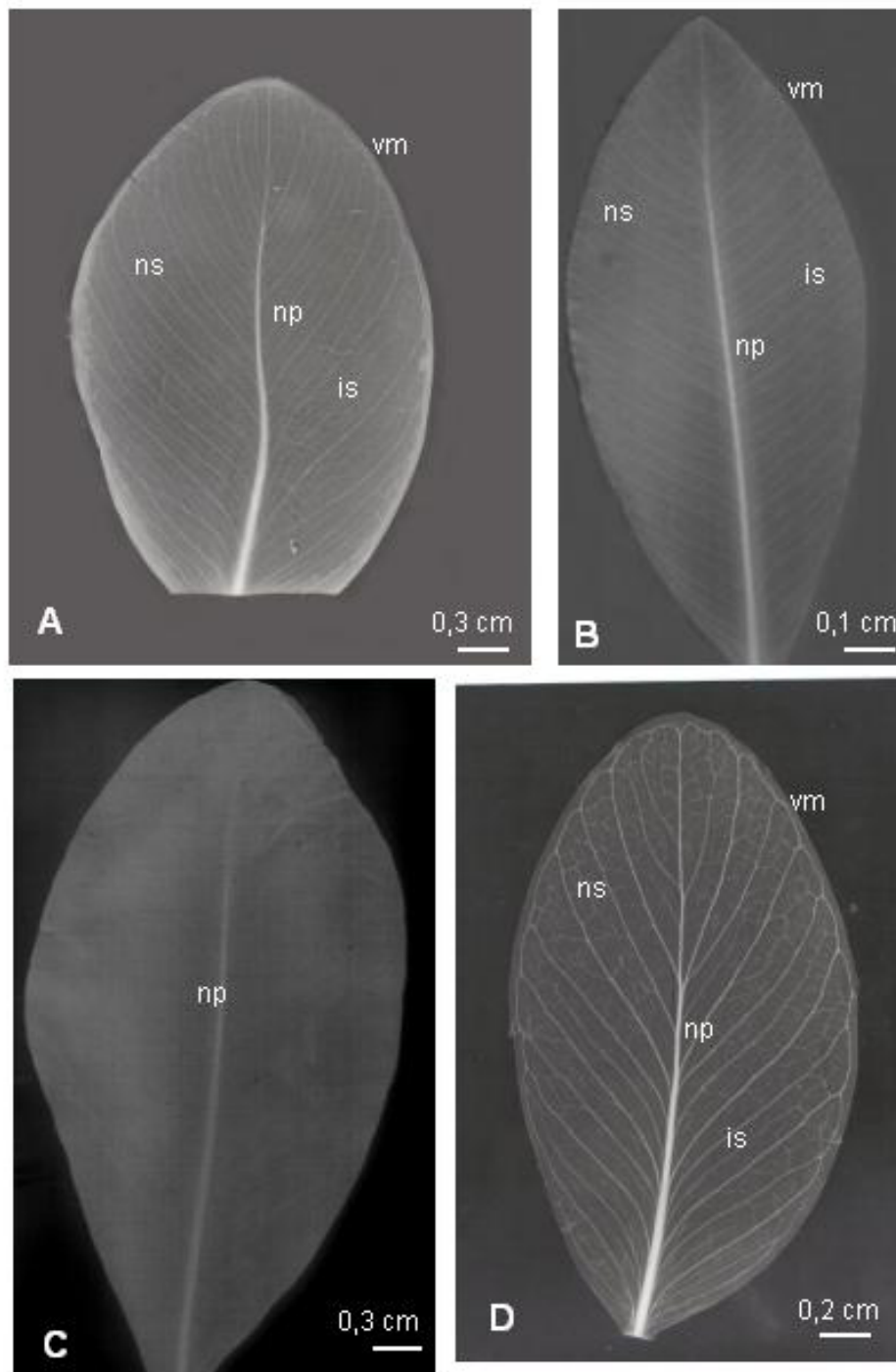
podem causar injúrias no aparato bucal ou dificultar a digestão dos predadores, nas espécies aqui analisadas não havia indícios de predação.

Preiss & Sivak (1996) observaram grãos de amido na maioria das plantas e em diferentes estruturas: raízes, ramos, folhas, frutos e grãos de pólen. Ocorrem dentro de plastídeos, organizados em grânulos semicristalinos de tamanhos e formas que variam entre espécies, órgãos e estágios de desenvolvimento. Os grãos de amido, nas espécies estudadas, apresentam forma ovóide e foram encontrados, principalmente, ao redor do cilindro vascular da nervura principal – bainha amilífera, no tecido parenquimático acima da epiderme abaxial na região da nervura principal e no tecido parenquimático circundante aos elementos condutores.

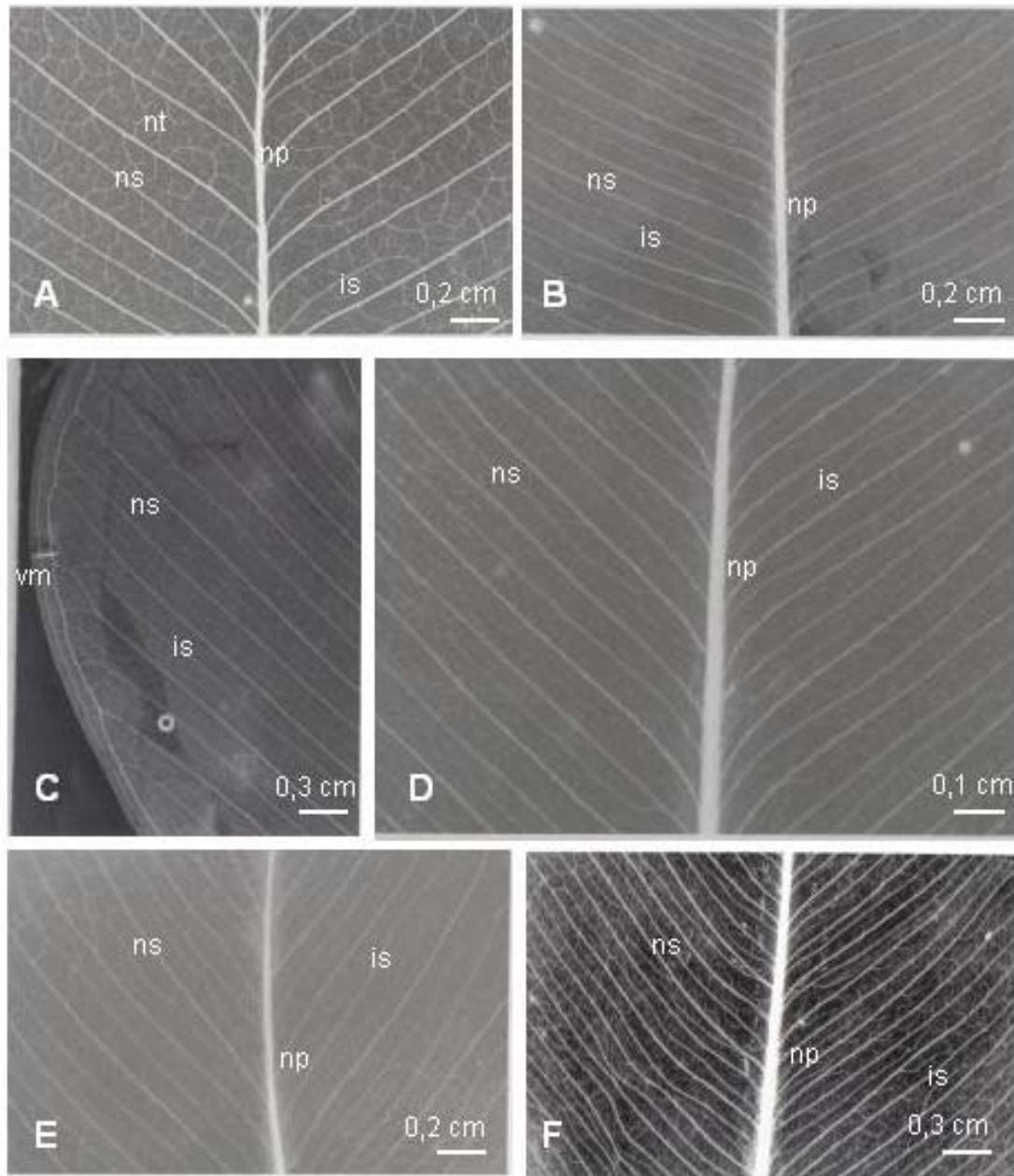
A utilização de análises histoquímicas combinadas visou à determinação da natureza química dos principais cristais e produtos secretados nas diferentes espécies em estudo. Esta determinação possibilitou somente a separação de *C. burchellii* das demais espécies do gênero, pois foi a única que apresentou lignina no tecido subepidérmico de ambas as faces; outra diferença entre as espécies foi a distribuição dos açúcares redutores ao longo da lâmina foliar ou somente na epiderme. As análises histoquímicas podem também, futuramente, auxiliar no entendimento das possíveis substâncias de interesse medicinal ou comercial dessas espécies.



**Fig. 2.** Aspectos da morfologia e arquitetura foliar I. Folhas peninérvias mostrando nervura primária (np) reta, secundária (ns) com espaçamento uniforme e ângulos geralmente agudos moderados, intersecundárias (is) com origem exmedial e ângulos agudos e veia última marginal (vm) do tipo fimbrial. **A:** *Clusia burchellii* com folha obovada, com ápice obtuso e arredondado. **B:** *C. criuva* com folha elíptica, com ápice agudo e nervuras secundárias com ângulo agudo amplo. **C:** *Clusia fluminensis* com folha obovada, com ápice obtuso e arredondado e redução dos ângulos das nervuras secundárias nesta região. **D:** *Clusia gardneri* com folha elíptica, com ápice obtuso e retuso e redução dos ângulos das nervuras secundárias nesta região.

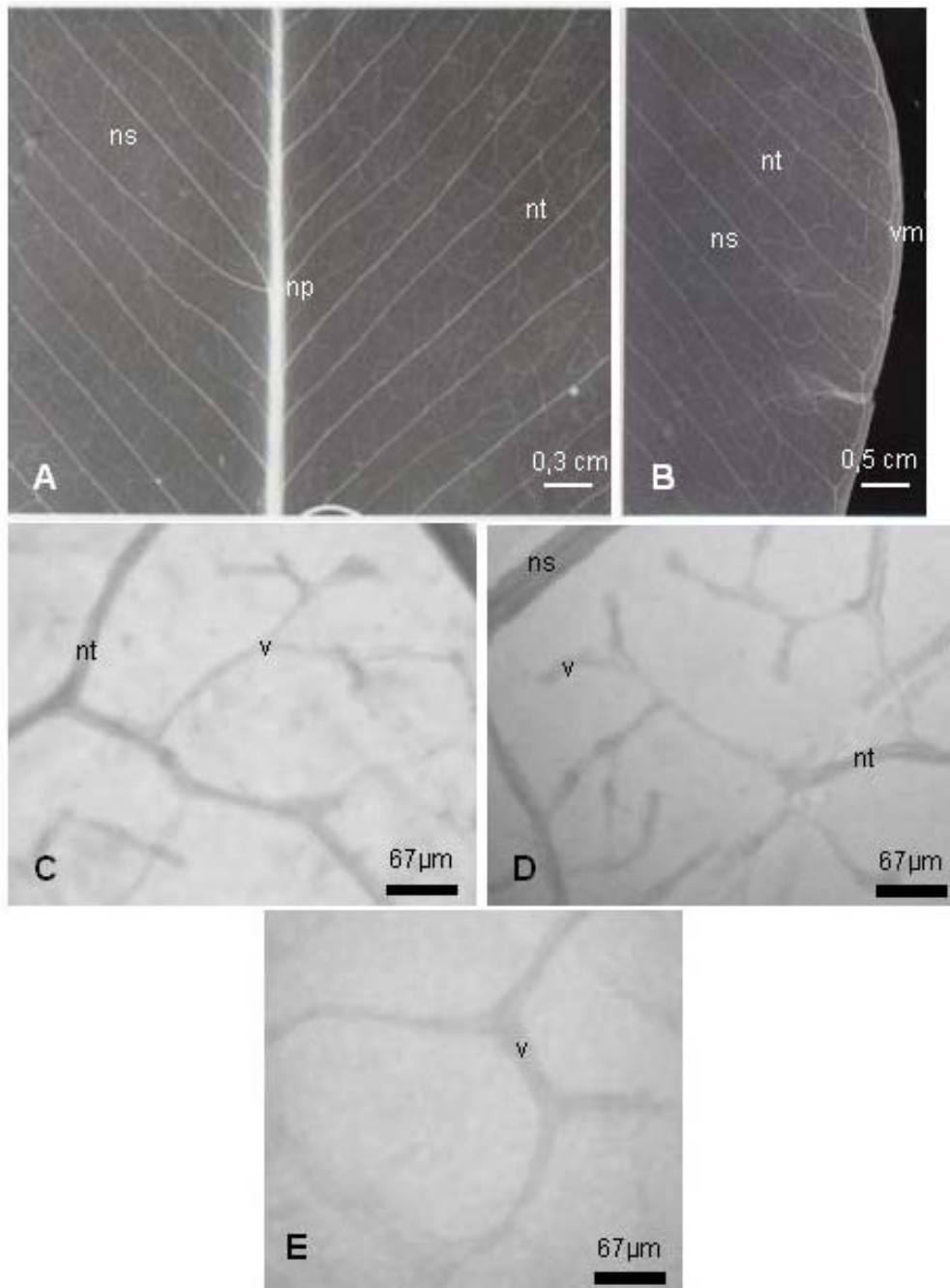


**Fig. 3.** Aspectos da morfologia e arquitetura foliar II. Folhas peninérvias mostrando nervura primária (np) reta, secundárias (ns) com espaçamento uniforme e ângulos agudos moderados, intersecundárias (is) com origem exmedial e ângulos agudos e veia última marginal (vm) do tipo fimbrial. **A:** *Clusia hilariana* com folha elíptica, ápice obtuso e retuso e redução dos ângulos das nervuras secundárias nesta região. **B:** *Clusia insignis* com folha elíptica e ápice agudo. **C:** *Clusia nemorosa* com folha elíptica, ápice agudo e retuso. **D:** *Clusia lanceolata* com folha elíptica, ápice obtuso e retuso e redução dos ângulos das nervuras secundárias nesta região, notam-se invaginações nas áreas de contato entre veia última marginal e nervura secundária.

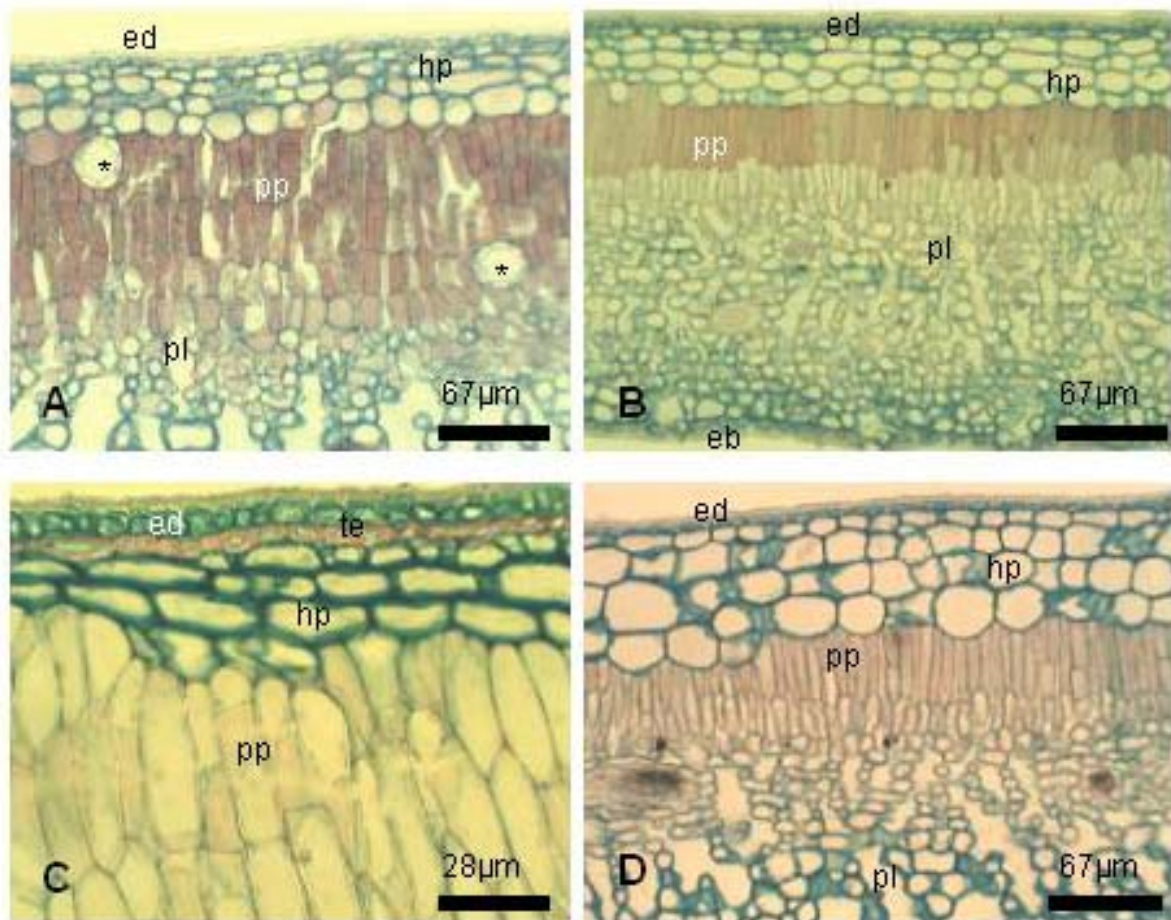


**Fig. 4.** Detalhe das folhas diafanizadas I, mostrando nervura primária (np) reta, secundária (ns) com espaçamento uniforme, intersecundárias (is) com origem exmedial e ângulos agudos, terciárias (nt) com ângulos retos. **A:** *Clusia burchellii* com nervuras secundárias com ângulos agudos moderados e terciárias (nt) com ângulos retos. **B:** *Clusia criuva* com nervuras secundárias com ângulo agudo amplo. **C:** *Clusia fluminensis* com veia última marginal (vm) do tipo fimbrial e invaginações na área de contato com as nervuras secundárias. **D:** *Clusia gardneri* com nervuras secundárias com ângulos agudos moderados. **E:** *Clusia hilariana* com nervuras secundárias com ângulos agudos moderados. **F:** *Clusia insignis* com nervuras secundárias com ângulos agudos moderados.

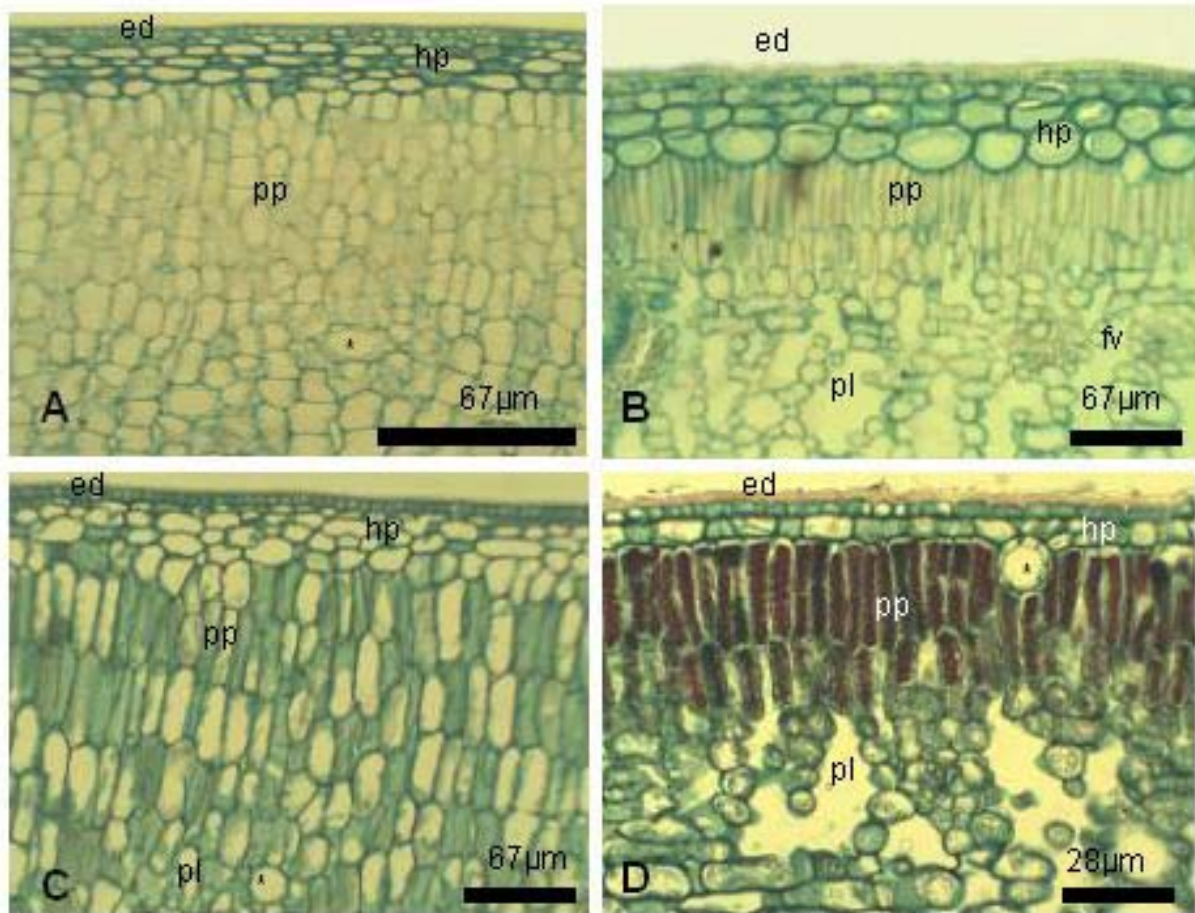




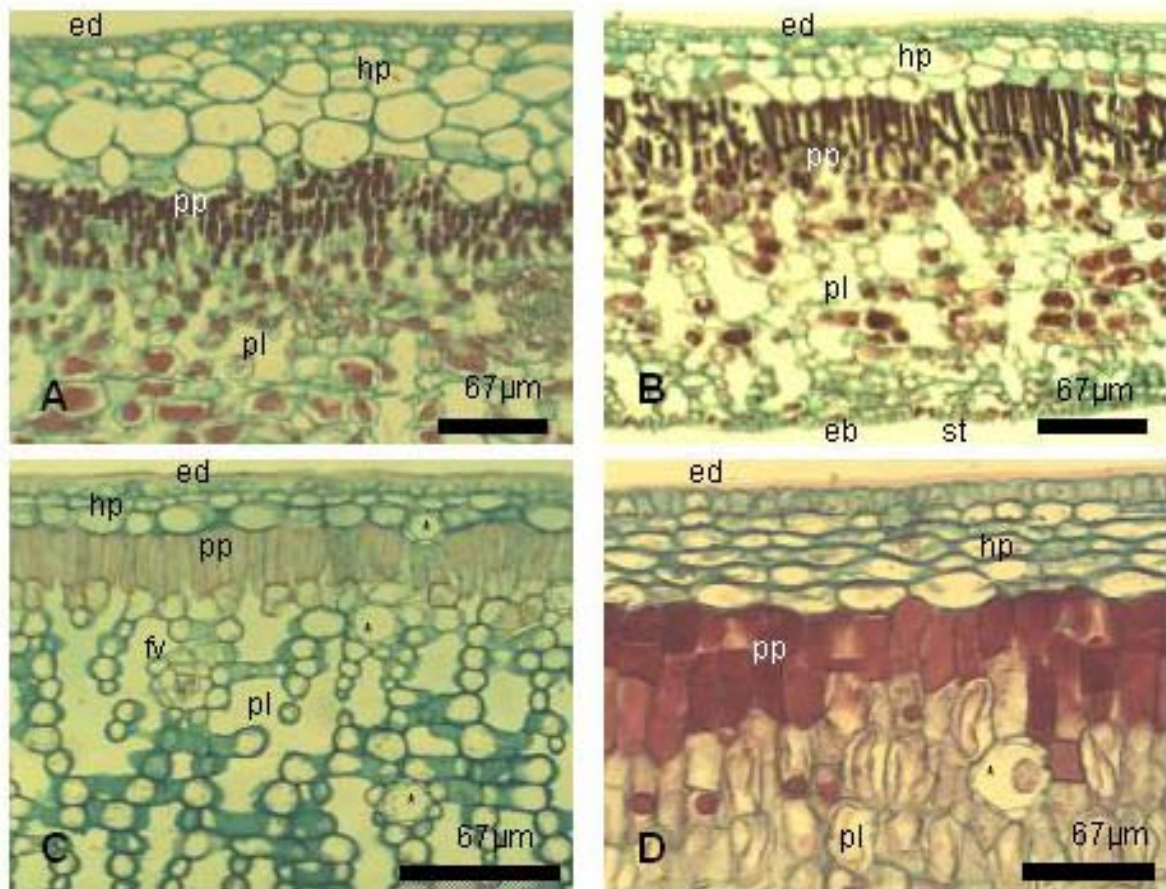
**Fig. 5.** Detalhe das folhas diafanizadas II. **A:** *Clusia nemorosa* com nervura primária (np) reta, secundária (ns) com ângulos agudos moderados, terciárias (nt) com ângulos retos. **B:** *Clusia nemorosa* com nervuras terciárias (nt) com ângulos retos e veia última marginal (vm) com invaginações no contato com as nervuras secundárias (ns). **C:** *Clusia criuva* com vênulas (v) ramificadas dicotomicamente. **D:** *Clusia lanceolata* com vênulas (v) ramificadas dicotomicamente. **E:** *Clusia nemorosa* apresentando a venação dicotômica das vênulas (v).



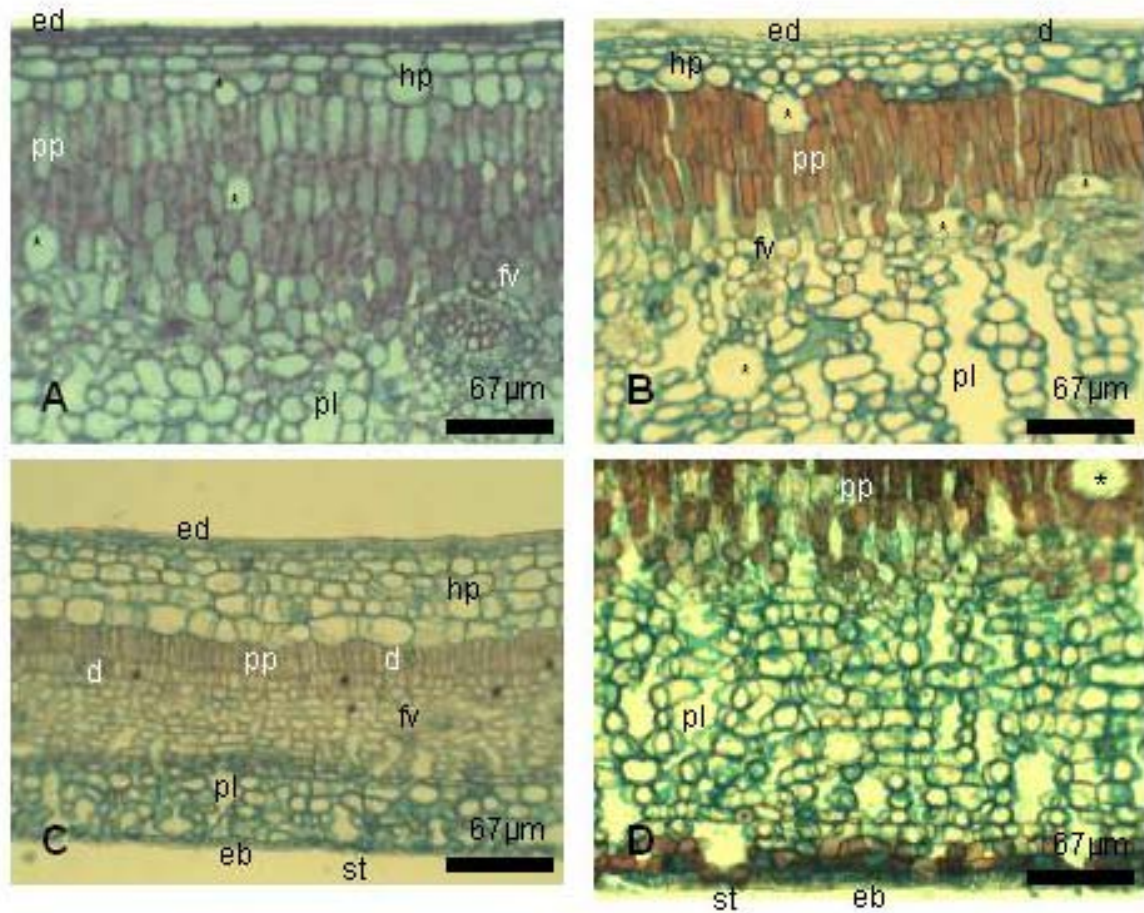
**Fig. 6.** Secções transversais I, face adaxial da lâmina foliar evidenciando epiderme (ed), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia aemygdioi* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme de 4-5 estratos, parênquima paliçádico de 3-4 estratos com ductos secretores (\*) e parênquima lacunoso com espaços intercelulares. **B:** *Clusia arrudae* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme de 4-5 estratos, parênquima paliçádico de 3-4 estratos, parênquima lacunoso de 15-17 estratos com espaços intercelulares, epiderme em sua face abaxial (eb) com células menores e cutícula menos espessa que na face adaxial. **C:** *Clusia burchellii* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula lisa com flanges, tecido esclerenquimático subepidérmico (te) e hipoderme com cerca de 3 estratos. **D:** *Clusia criuva* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula lisa, hipoderme de 4-5 estratos, parênquima paliçádico com cerca de 2 estratos e parênquima lacunoso com numerosos espaços intercelulares.



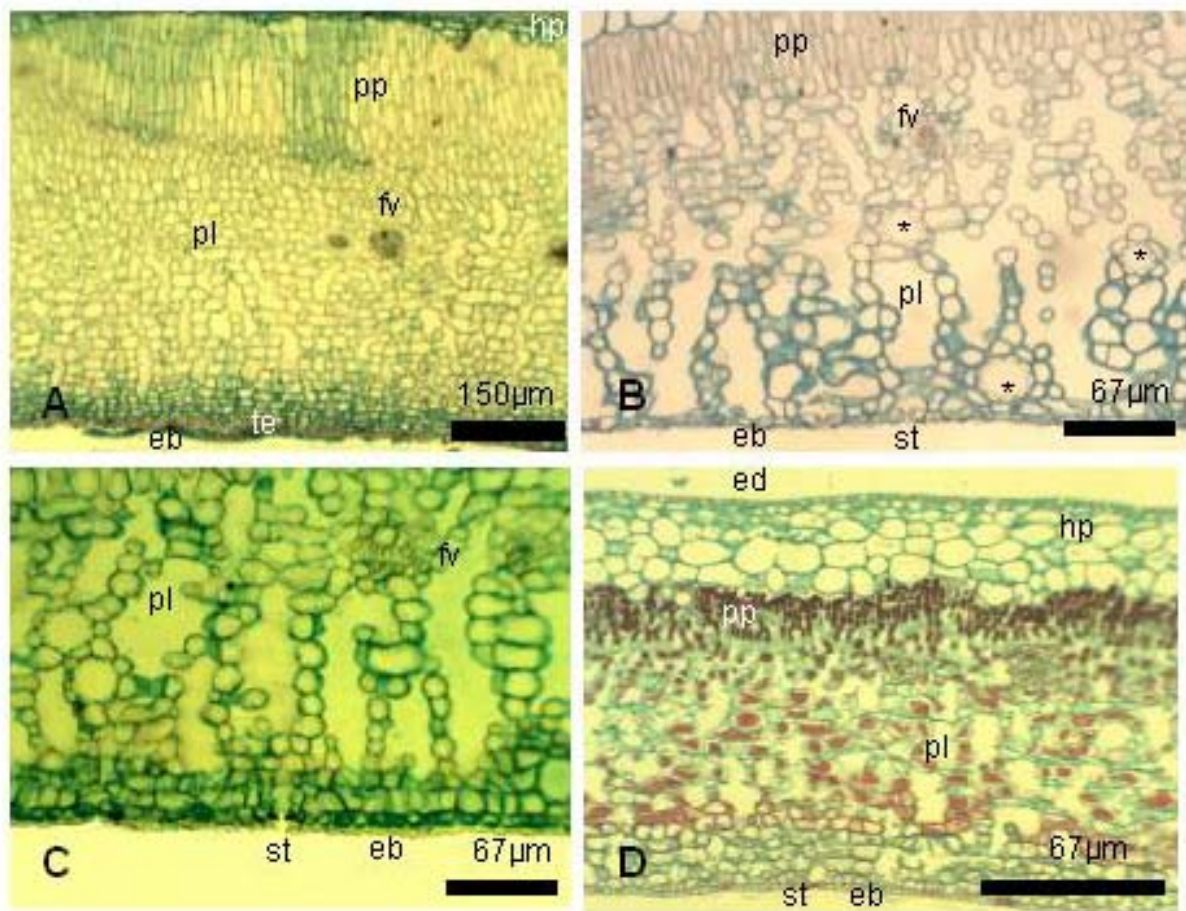
**Fig. 7.** Secções transversais II, face adaxial da lâmina foliar evidenciando epiderme (ed), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia fluminensis* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme de 4-5 estratos e parênquima paliçádico com cerca de 9 estratos com ductos secretores (\*). **B:** *Clusia gardneri* com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme com cerca de 3 estratos, parênquima paliçádico com 2 estratos e parênquima lacunoso com feixes vasculares (fv) e numerosos espaços intercelulares. **C:** *Clusia hilariana* com células epidérmicas comuns quadradas recobertas por cutícula lisa, hipoderme de 4-5 estratos, parênquima paliçádico com cerca de 6 estratos e parênquima lacunoso com ductos secretores (\*). **D:** *Clusia insignis* com células epidérmicas comuns quadradas recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme com uma única camada, parênquima paliçádico com cerca de 2 estratos, ducto secreteor (\*) no limite entre hipoderme e parênquima paliçádico, parênquima lacunoso com numerosos espaços intercelulares.



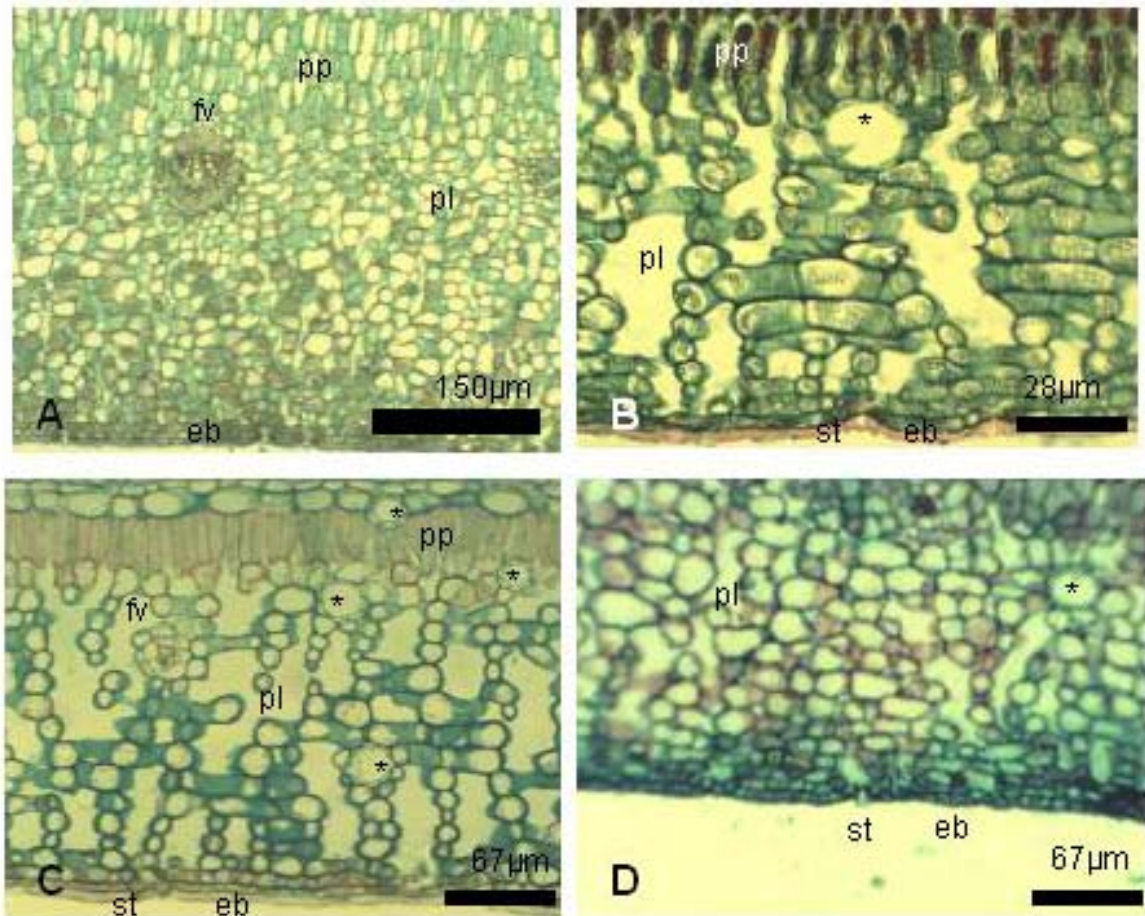
**Fig. 8.** Secções transversais III, face adaxial da lâmina foliar evidenciando epiderme (ed), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia intermedia*, folha masculina, com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme com cerca de 5 estratos, parênquima paliçádico de 3-4 estratos celulares e parênquima lacunoso com espaços intercelulares. **B:** *Clusia intermedia*, folha feminina, com células epidérmicas comuns quadradas, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme com cerca de 4 estratos, parênquima paliçádico de 2-3 estratos celulares, parênquima lacunoso com numerosos espaços intercelulares e epiderme em face abaxial (eb) com estômaros (st) nivelados. **C:** *Clusia nemorosa* com células epidérmicas comuns quadradas recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme com cerca de 2 estratos celulares, parênquima paliçádico com uma única camada de células, parênquima lacunoso com feixe vascular (fv) e numerosos espaços intercelulares, ductos secretores (\*) dispersos ao longo do mesofilo. **D:** *Clusia spiritu-sanctensis* com células epidérmicas comuns quadradas recobertas por cutícula lisa, hipoderme de 4-5 estratos de células indiferenciadas entre si, parênquima paliçádico de 3-4 estratos com ducto secretor (\*).



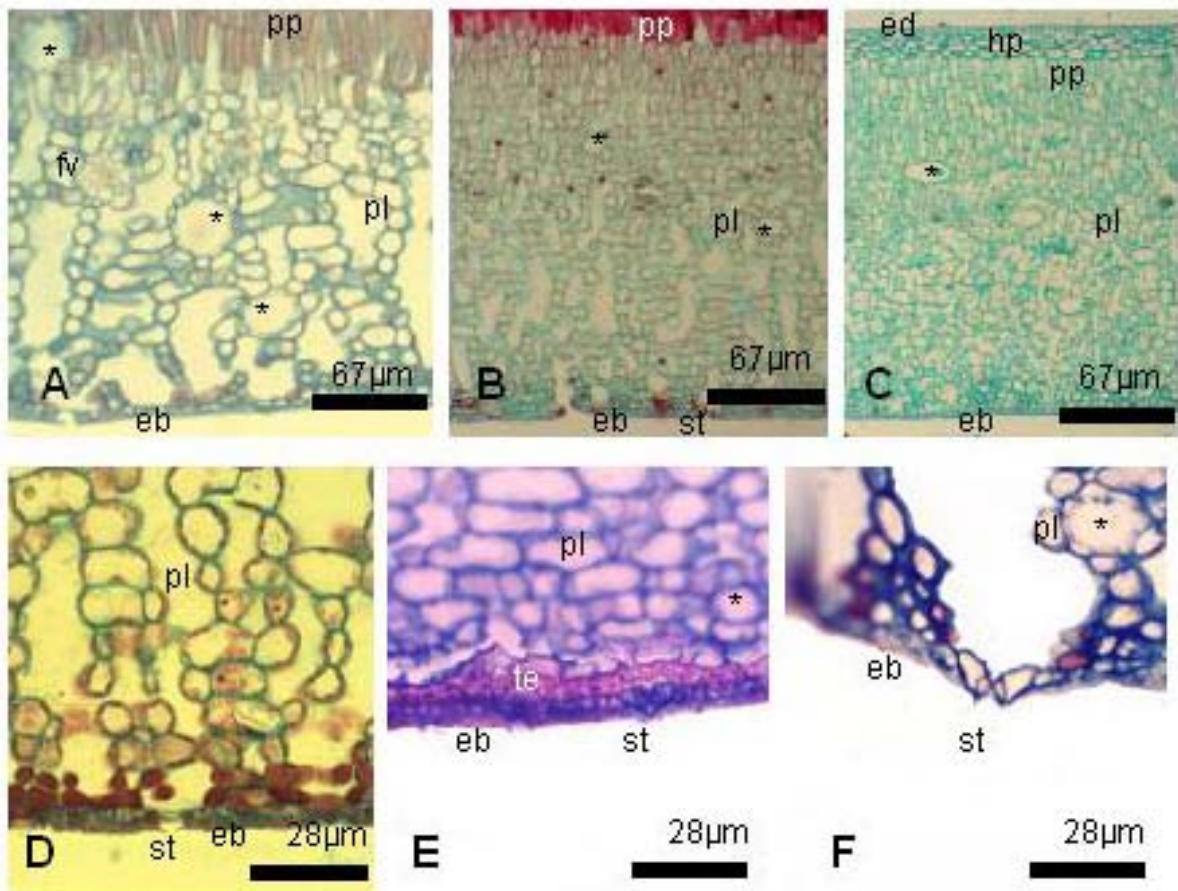
**Fig. 9.** Secções transversais da lâmina foliar IV, evidenciando epiderme em face adaxial (ed), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia lanceolata* com células epidérmicas comuns retangulares, recobertas por cutícula lisa, hipoderme de 4-5 estratos, parênquima paliçádico de 3-4 estratos celulares, parênquima lacunoso com espaços intercelulares, presença de ductos secretores (\*) ao longo do mesofilo e feixe vascular (fv) com bainha parenquimática. **B:** *Clusia marizii* com células epidérmicas comuns retangulares, recobertas por cutícula ornamentada, hipoderme de 4-5 estratos com drusa (d), parênquima paliçádico de 3-4 estratos celulares, parênquima lacunoso com numerosos espaços intercelulares, ductos secretores (\*) ao longo do mesofilo e feixe vascular (fv) com bainha parenquimática. **C:** *Clusia parviflora* com células epidérmicas comuns retangulares recobertas por cutícula lisa, hipoderme com maior número de camadas entre as espécies (5-6), parênquima paliçádico com cerca de 2 camadas e presença de drusas (d), parênquima lacunoso de 15-17 camadas com feixe vascular (fv) e epiderme em face abaxial (eb) com estômatos (st) evidenciando câmara subestomática e cristas. **D:** *Clusia aemygdioi* com ducto secretor (\*) no parênquima paliçádico, parênquima lacunoso de 15-17 estratos e epiderme em face abaxial (eb) com estômatos (st) evidenciando câmara subestomática.



**Fig. 10.** Secções transversais da lâmina foliar V, evidenciando epiderme em face adaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp), parênquima lacunoso (pl) e epiderme em face abaxial (eb). **A:** *Clusia burchellii* com mesofilo denso, com poucos espaços intercelulares no parênquima lacunoso de 20-26 estratos, presença de feixe vascular (fv) e tecido esclerenquimático subepidérmico (te). **B:** *Clusia criuva* com parênquima lacunoso de 15-17 estratos, com feixe vascular (fv) e ductos secretores (\*), epiderme em face abaxial com estômatos (st) com câmara subestomática. **C:** *Clusia gardneri* com parênquima lacunoso de 15-17 camadas com feixe vascular (fv) e epiderme em face abaxial (eb) com estômatos (st) evidenciando cristas. **D:** *Clusia intermedia*, folha masculina com parênquima lacunoso de 15-17 estratos e epiderme em face abaxial (eb) com estômatos (st) evidenciando câmara subestomática.

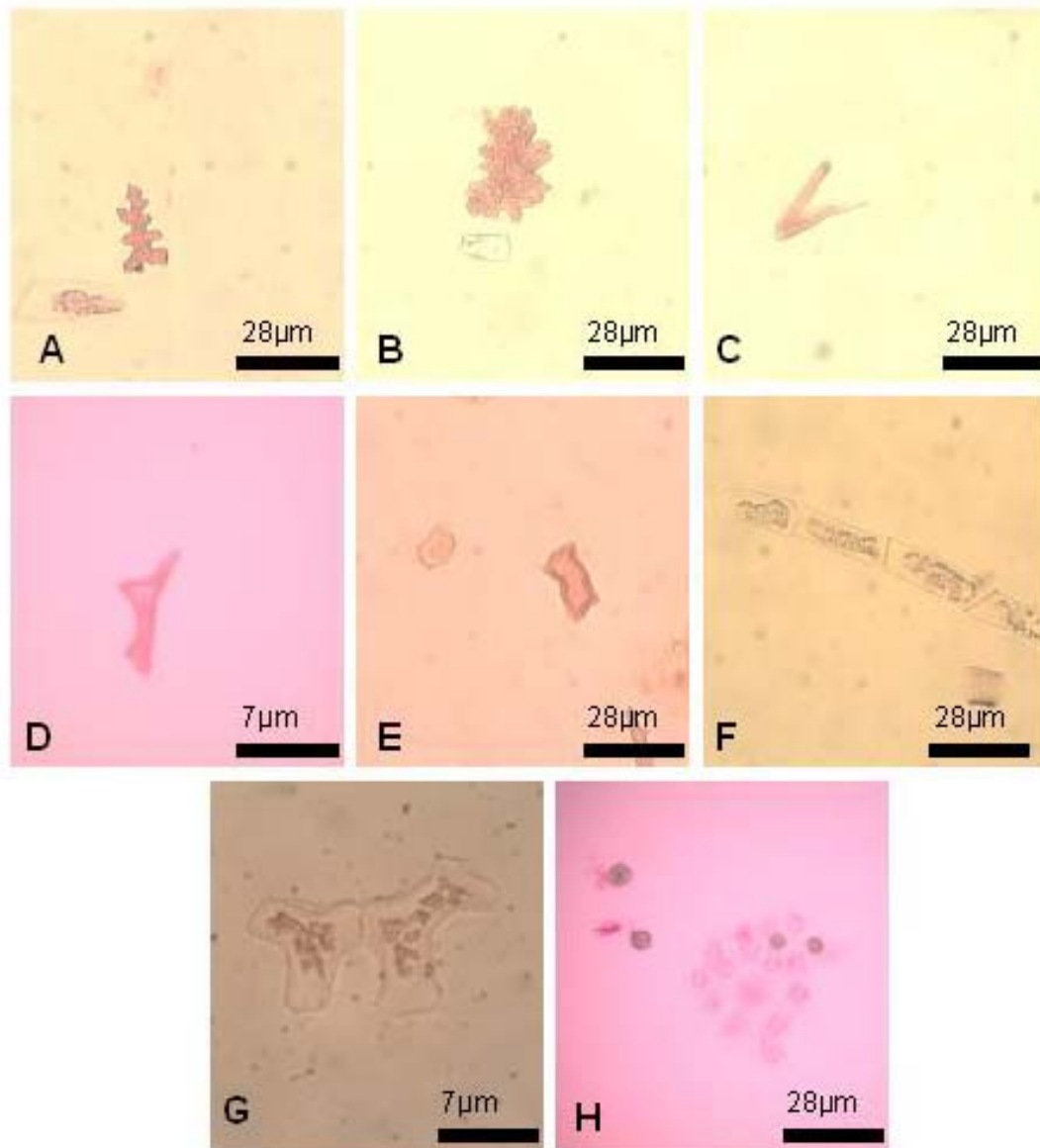


**Fig. 11.** Secções transversais da lâmina foliar VI, evidenciando parênquima paliádico (pp), parênquima lacunoso (pl) e epiderme em face abaxial (eb). **A:** *Clusia hilariana* com mesofilo denso, com poucos espaços intercelulares no parênquima lacunoso com cerca de 18 estratos, presença de feixe vascular (fv) circundado por fibras. **B:** *Clusia insignis* com o menor número de camadas no parênquima lacunoso (12), presença de ducto secretor (\*), epiderme em face abaxial cutícula espessa e estômato (st) com crista e câmara subestomática ausente. **C:** *Clusia nemorosa* com parênquima lacunoso com cerca de 13 camadas com feixe vascular (fv) envolto por bainha parenquimática, ductos secretores (\*) ao longo do mesofilo e epiderme em face abaxial (eb) com estômato (st) evidenciando cristas. **D:** *Clusia lanceolata* com parênquima lacunoso de 15-17 estratos com reduzidos espaços intercelulares e epiderme em face abaxial (eb) com estômatos (st) evidenciando câmara subestomática.

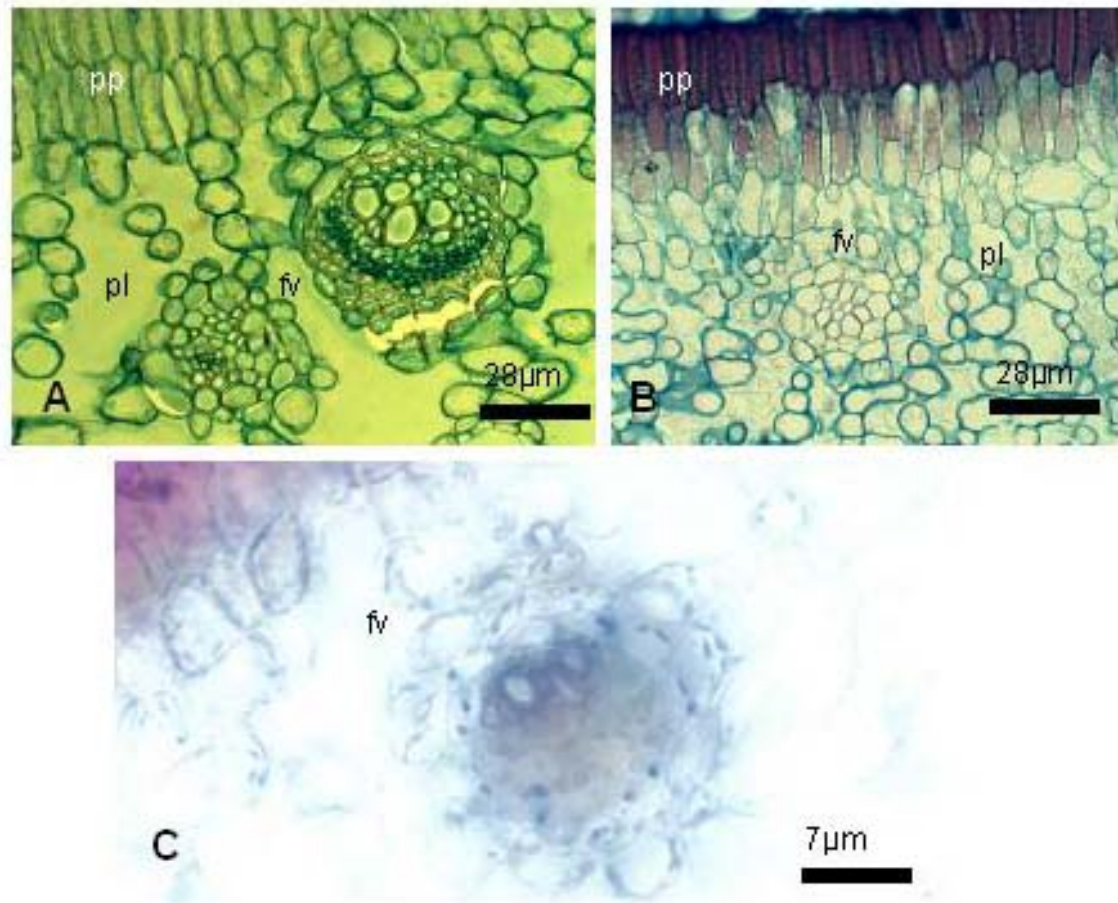


**Fig. 12.** Secções transversais da lâmina foliar VII, evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb) com presença de estômato (st), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia marizii* com muitos espaços intercelulares no parênquima lacunoso de 15-17 estratos, presença de feixe vascular (fv) com bainha parenquimática e ductos secretores (\*). **B:** *Clusia spiritu-sanctensis* com parênquima lacunoso de 25-27 estratos celulares, com reduzidos espaços intercelulares e ducto secretor (\*), epiderme em face abaxial com estômato com câmara subestomática. **C:** *Clusia fluminensis* com a maior quantidade de camadas celulares no parênquima lacunoso (30) e ducto secretor (\*). **D:** *Clusia aemygdioi* com estômato com câmara subestomática e cristas. **E:** *Clusia burchellii* com discreta câmara subestomática interrompendo parcialmente o tecido esclerenquimático (te) e presença de ducto secretor (\*) no parênquima lacunoso. **F:** *Clusia marizii* com células subsidiárias maiores que as demais células epidérmicas e ducto secretor (\*) no parênquima lacunoso.

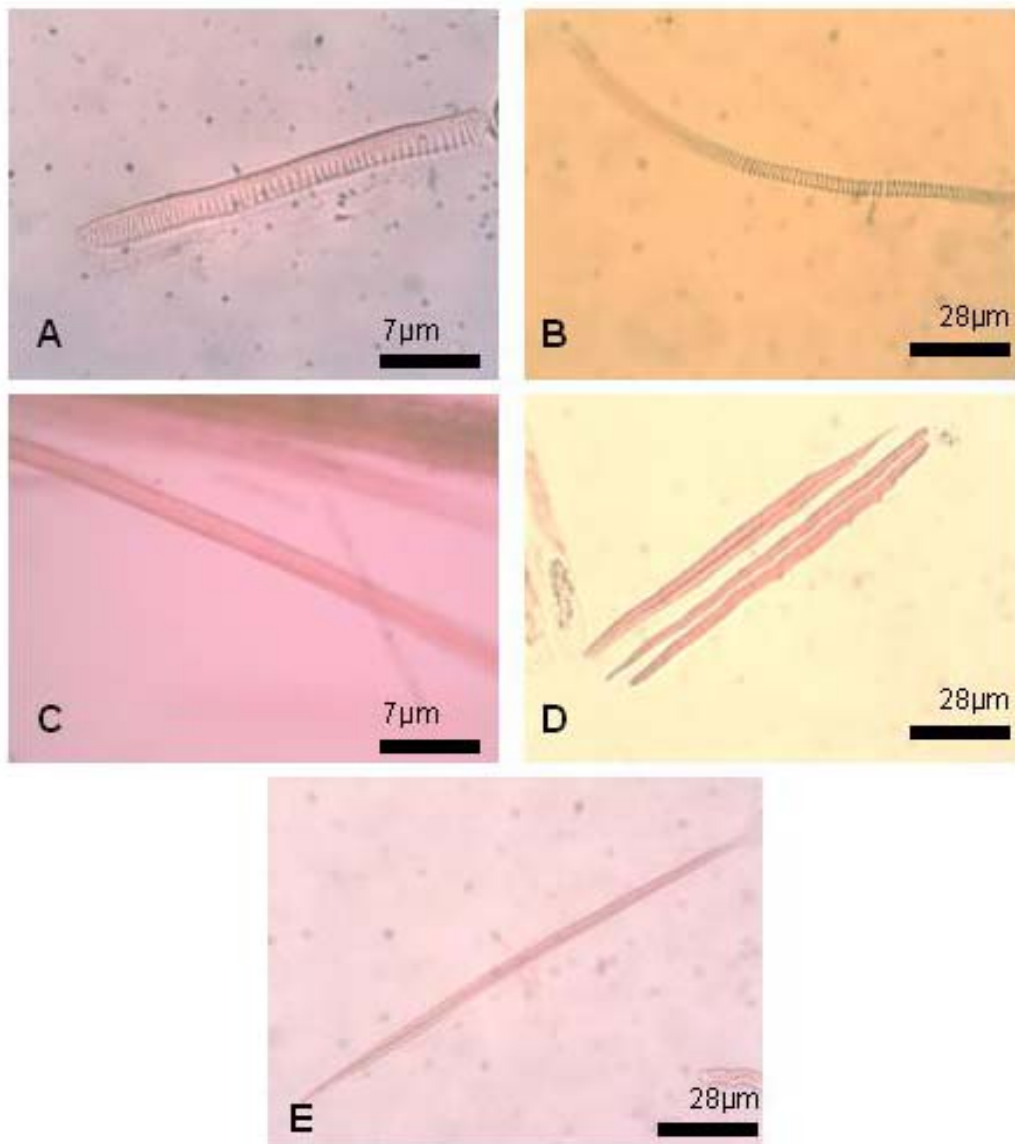




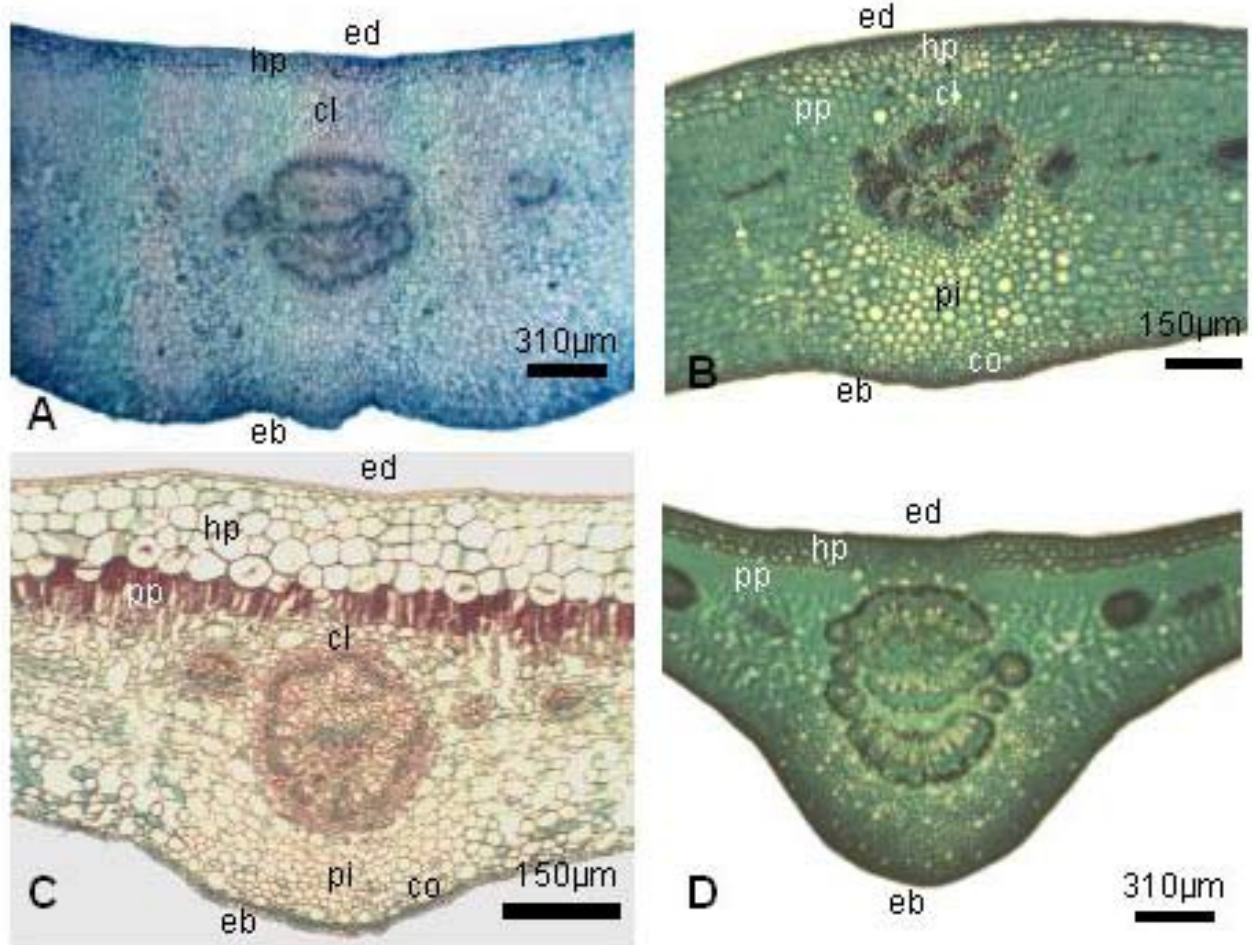
**Fig. 13.** Amostras dissociadas da porção mediana das lâminas foliares I. **A:** Esclereídeo raquiforme de *Clusia burchellii*. **B:** Astroesclereídeos de *Clusia burchellii*. **C:** Esclereídeo bifurcado de *Clusia fluminensis*. **D:** Osteoesclereídeo de *Clusia nemorosa*. **E:** Esclereídeo colunar de *Clusia criuva*. **F:** Células alongadas do parênquima paliçádico de *Clusia arrudae*. **G:** Células braciformes do parênquima lacunoso de *Clusia intermedia*. **H:** Células parenquimáticas isodiamétricas contendo drusas no interior, de *Clusia lanceolata*.



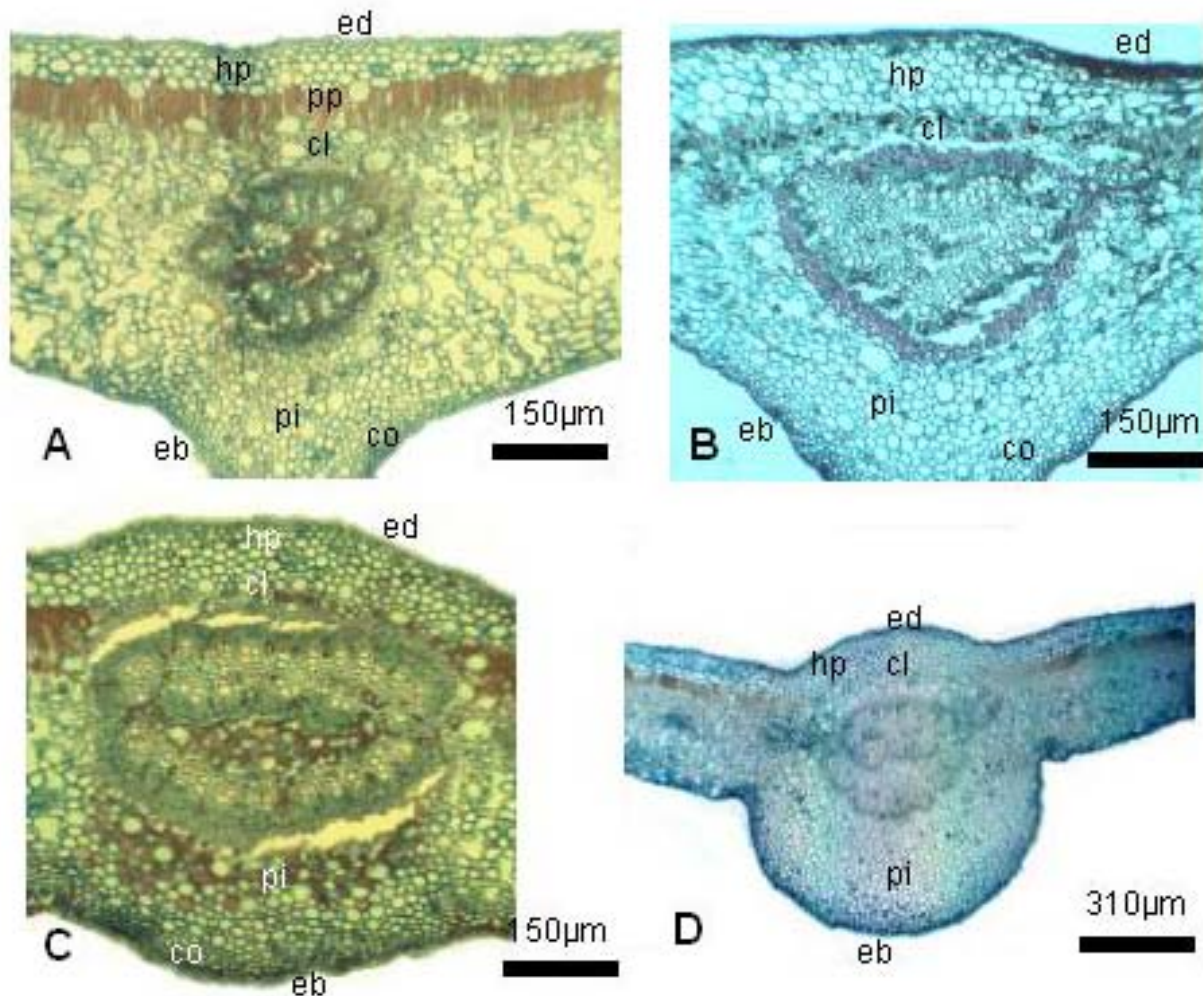
**Fig. 14.** Secções transversais dos feixes vasculares (fv) presentes no parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia gardneri* apresentando nervura de pequeno porte com feixes vascular envolto por bainha parenquimática e nervura de médio porte com feixe vascular envolto por bainha esclerenquimática e calota esclerenquimática na região do floema. **B:** *Clusia arrudae* apresentando feixe vascular composto por apenas elementos do xilema. **C:** *Clusia criuva* apresentando feixe vascular envolto por bainha parenquimática contendo cloroplastos no interior das células.



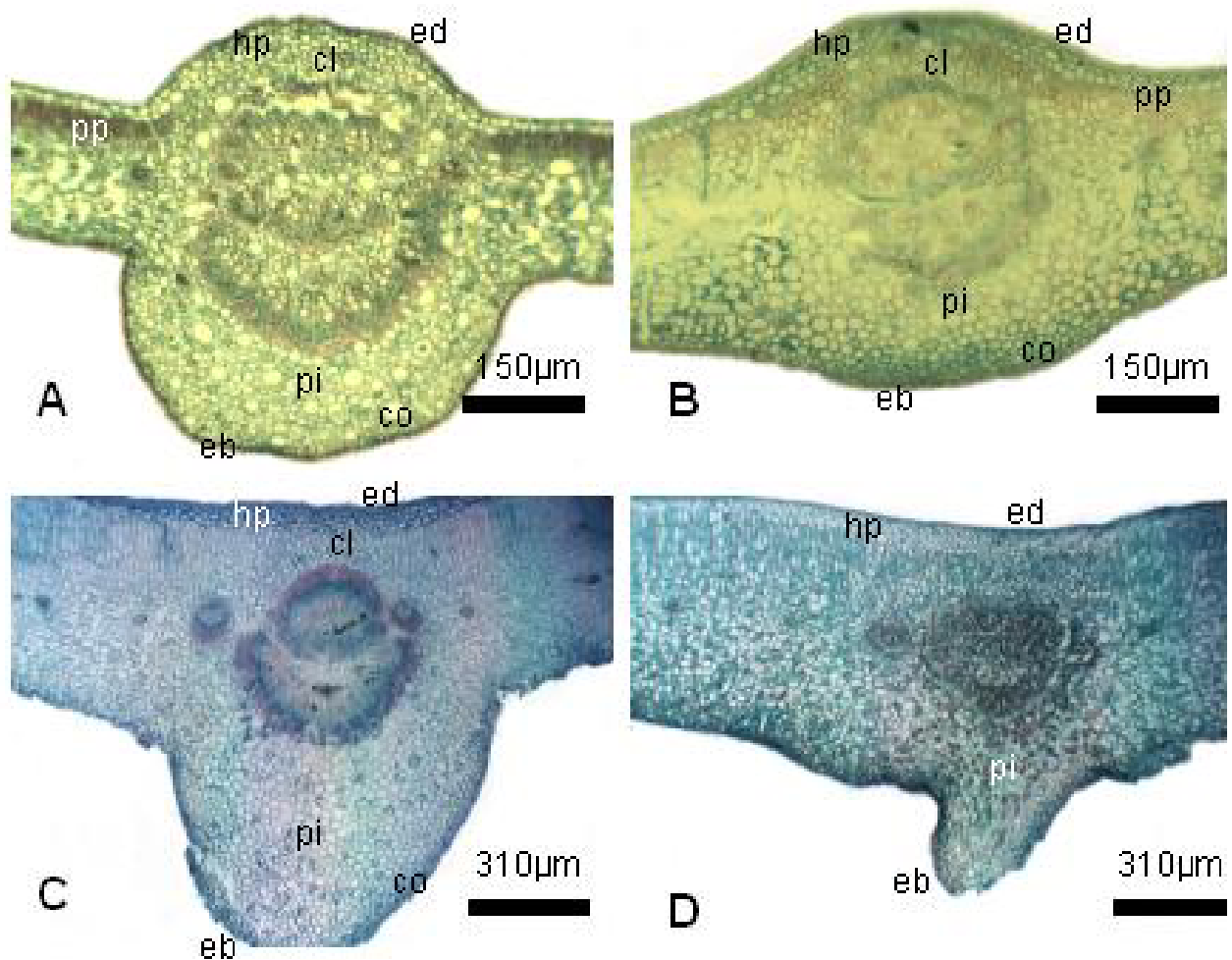
**Fig. 15.** Amostras dissociadas da porção mediana das lâminas foliares II. **A:** Elemento de vaso de *Clusia gardneri*. **B:** Espessamento helicoidal do elemento de vaso de *Clusia gardneri*. **C:** Espessamento reticulado do elemento de vaso de *Clusia burchellii*. **D:** Traqueídeos de *Clusia burchellii*. **E:** Fibra libriforme de *Clusia hilariana*.



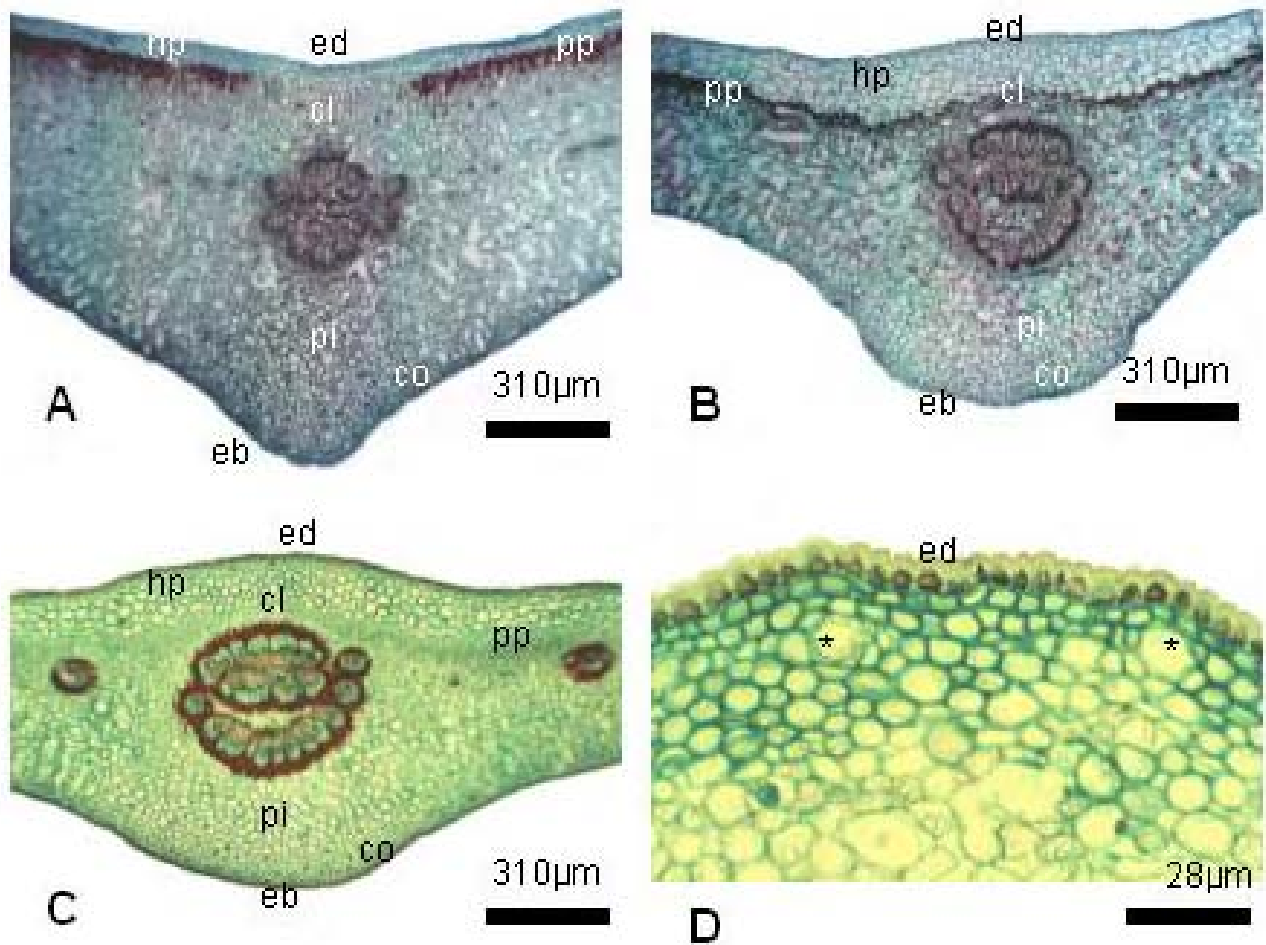
**Fig. 16.** Secções transversais na região da nervura principal I, evidenciando epideme em sua face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp), clorênquima (cl), parênquima de células isodiamétricas (pi) e colênquima angular (co). **A:** *Clusia fluminensis* com nervura principal indiferenciada do restante da lâmina e parênquima paliçádico interrompido por células retangulares de clorênquima. **B:** *Clusia lanceolata* com nervura principal indiferenciada do restante da lâmina e parênquima paliçádico totalmente interrompido por células isodiamétricas de clorênquima. **C:** *Clusia criuva* com convexidade apenas para a face abaxial e parênquima paliçádico parcialmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima. **D:** *Clusia gardneri* com convexidade apenas para a face abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima.



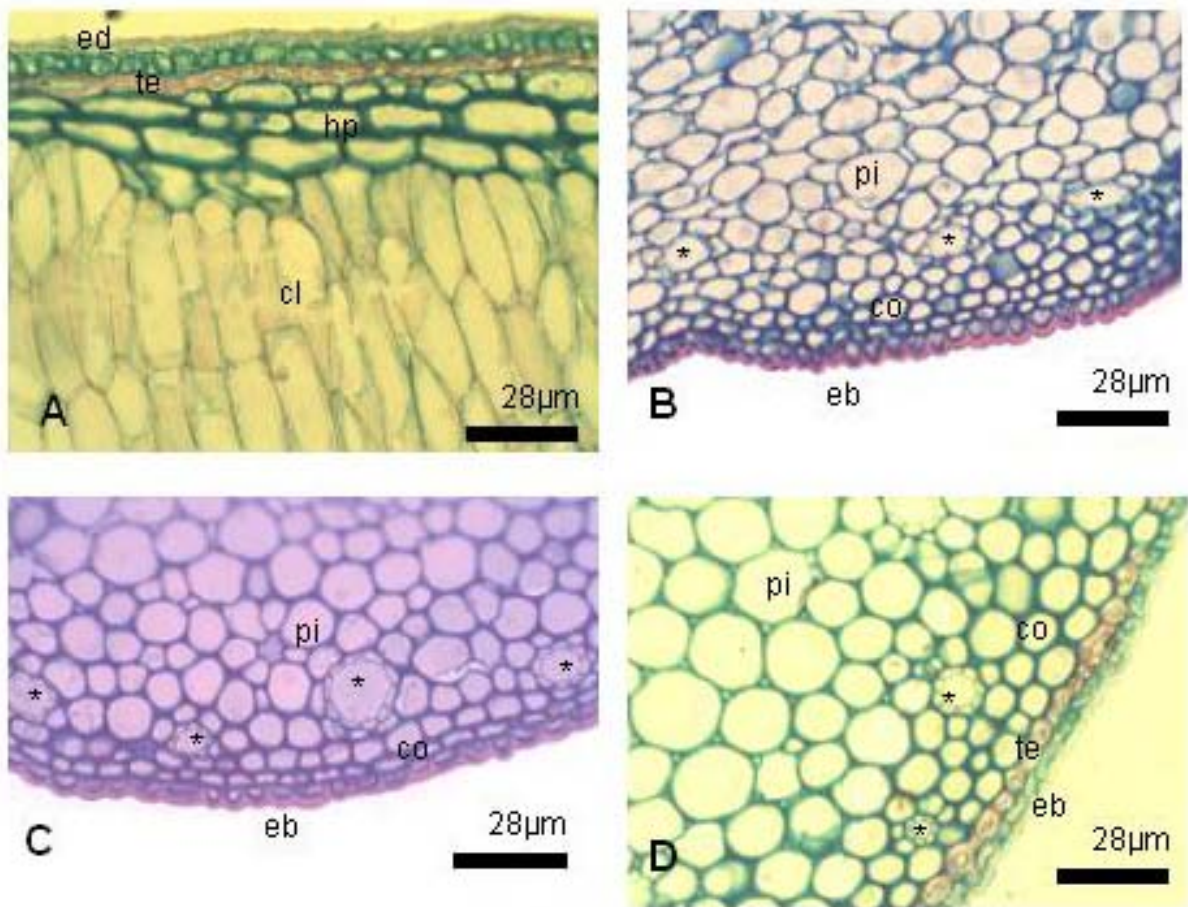
**Fig. 17.** Secções transversais na região da nervura principal II, evidenciando epideme em sua face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp), clorênquima (cl), parênquima de células isodiamétricas (pi) e colênquima angular (co). **A:** *Clusia marizii* com convexidade apenas para a face abaxial e parênquima paliçádico parcialmente interrompido pelo clorênquima de células isodiamétricas. **B:** *Clusia parviflora* com convexidade apenas para a face abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células retangulares do clorênquima. **C:** *Clusia amygdioi* com nervura principal com convexidades semelhantes para ambas as faces e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima. **D:** *Clusia arrudae* com nervura principal com convexidades para ambas as faces, mas com maior proeminência para a abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima.



**Fig. 18.** Secções transversais na região da nervura principal III, evidenciando epideme em sua face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp), clorênquima (cl), parênquima de células isodiamétricas (pi) e colênquima angular (co). **A:** *Clusia insignis* com convexidades para ambas as faces, mas com maior proeminência para a abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima. **B:** *Clusia nemorosa* com convexidades para ambas as faces, mas com maior proeminência para a abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima. **C:** *Clusia burchellii* com convexidade com projeção triangular para a face abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima. **D:** *Clusia hilariana* com convexidade com projeção triangular para a face abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células isodiamétricas do clorênquima.

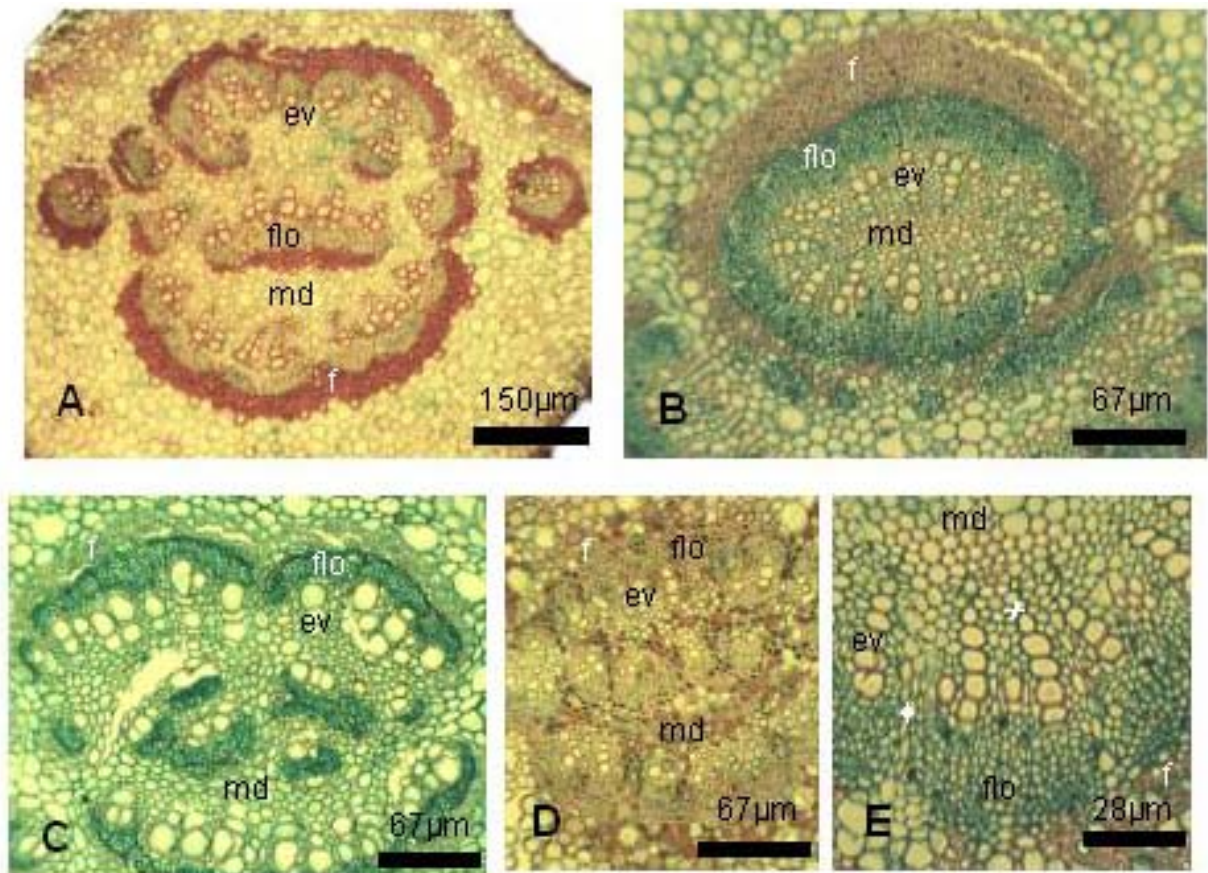


**Fig. 19.** Secções transversais na região da nervura principal IV, evidenciando epiderme em sua face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp), clorênquima (cl), parênquima de células isodiamétricas (pi) e colênquima angular (co). **A:** *Clusia spiritu-sanctensis* com convexidade com projeção triangular para a face abaxial e parênquima paliçádico totalmente interrompido pelas células retangulares do clorênquima. **B:** *Clusia intermedia*, folha masculina, com convexidade somente para a face abaxial e parênquima paliçádico interrompido pelas células retangulares do clorênquima. **C:** *Clusia intermedia*, folha feminina, com convexidades para ambas as faces, mas com maior proeminência para a face abaxial e parênquima paliçádico interrompido pelas células retangulares do clorênquima. **D:** *Clusia insignis* com epiderme em sua face adaxial com células comuns papilosas e flanges cuticulares, além de ductos secretores (\*) na hipoderme.

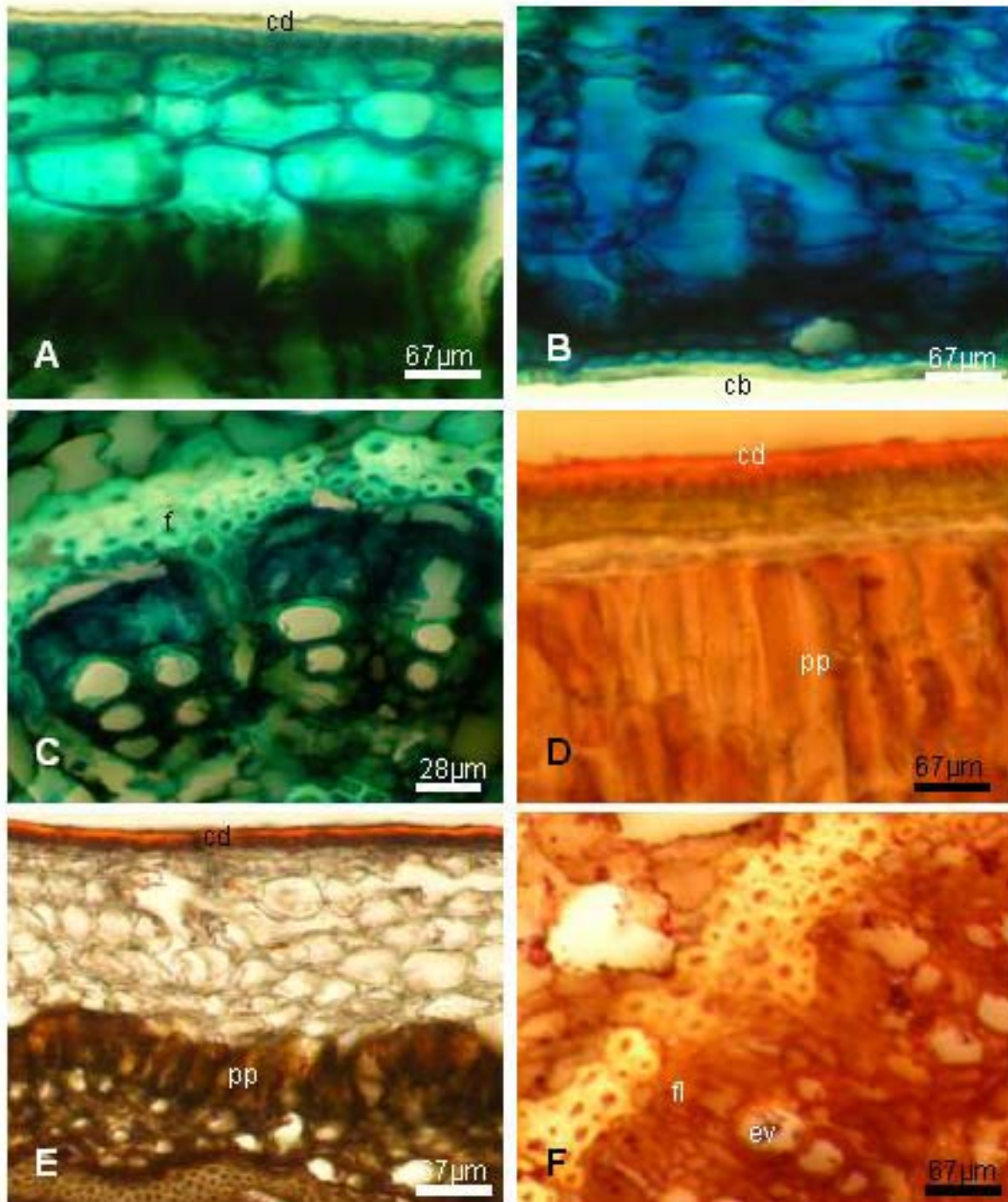


**Fig. 20.** Secções transversais na região da nervura principal V, evidenciando epiderme em sua face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima de células isodiamétricas (pi) e colênquima angular (co). **A:** *Clusia burchellii* com cutícula espessa recobrindo a epiderme em sua face adaxial e tecido esclerenquimático subepidérmico (te). **B:** *Clusia parviflora* com epiderme em sua face abaxial recoberta por cutícula espessa com flanges, além de ductos secretores (\*) na região do parênquima. **C:** *Clusia criuva* com epiderme em sua face abaxial recoberta por cutícula espessa com flanges, além de ductos secretores (\*) na região do parênquima. **D:** *Clusia burchellii* com epiderme em sua face abaxial recoberta por cutícula espessa com flanges, tecido esclerenquimático subepidérmico (te), além de ductos secretores (\*) na região do colênquima angular e parênquima.

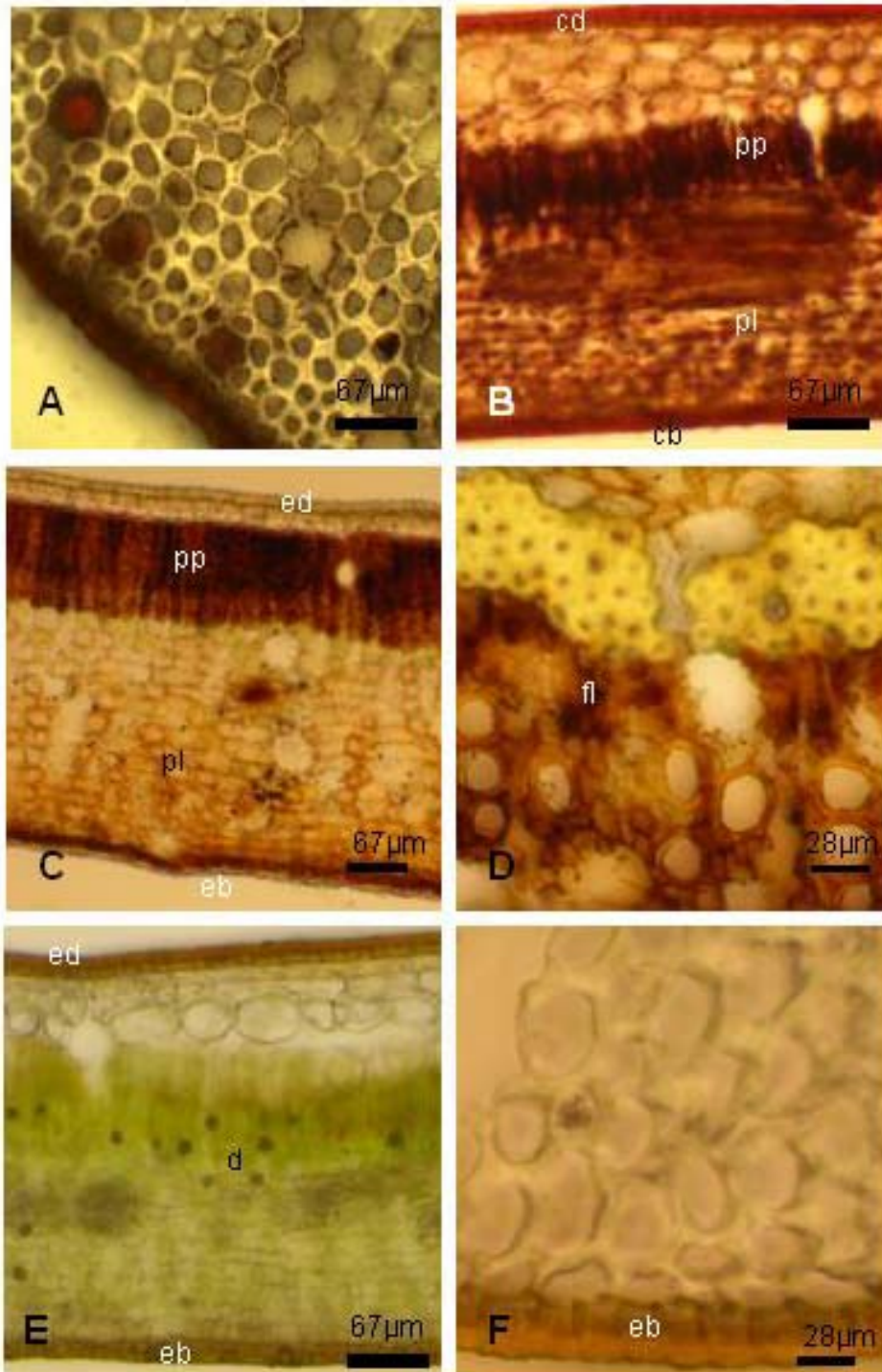




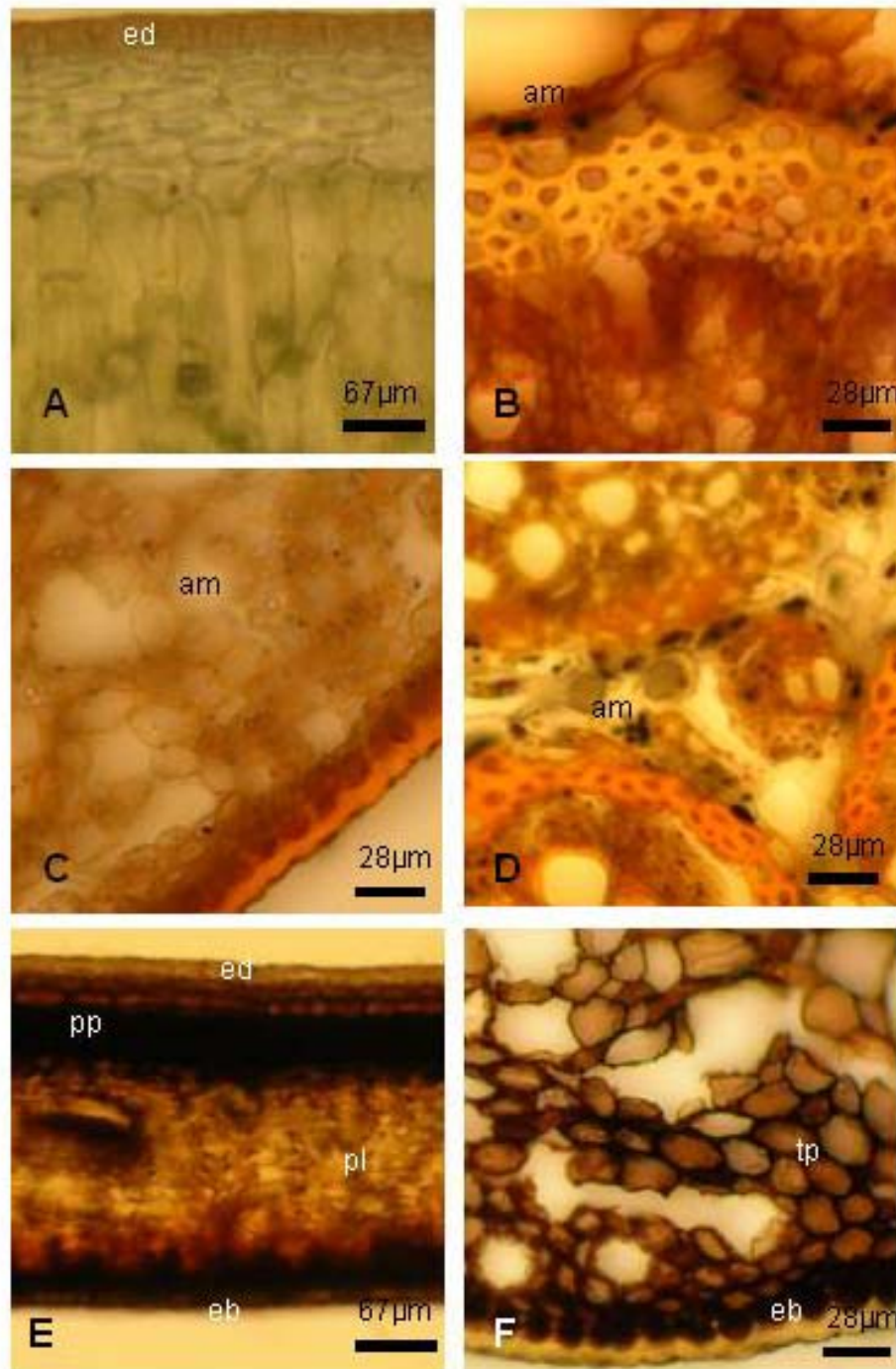
**Fig. 21.** Secções transversais na região da nervura principal VI, evidenciando o cilindro vascular composto por fibras do floema (fi), elementos do floema (flo), elementos de vaso (ev) e medula (md). **A:** *Clusia nemorosa* apresentando cilindro vascular incompleto com feixes separados por células parenquimáticas, medula parenquimática composta por células de parede delgada. **B:** *Clusia burchellii* com cilindro vascular totalmente envolto pelas fibras do floema, medula parenquimática composta por células de parede espessada desprovida de feixes vasculares internos. **C:** *Clusia gardneri* com duas fileiras de feixes na medula parenquimática. **D:** *Clusia aemygdioi* com somente uma fileira de feixes vasculares na medula parenquimática. **E:** *Clusia burchellii* apresentando início de crescimento secundário, nota-se elemento do protoxilema obliterado (+) e presença de parênquima radial (♦).



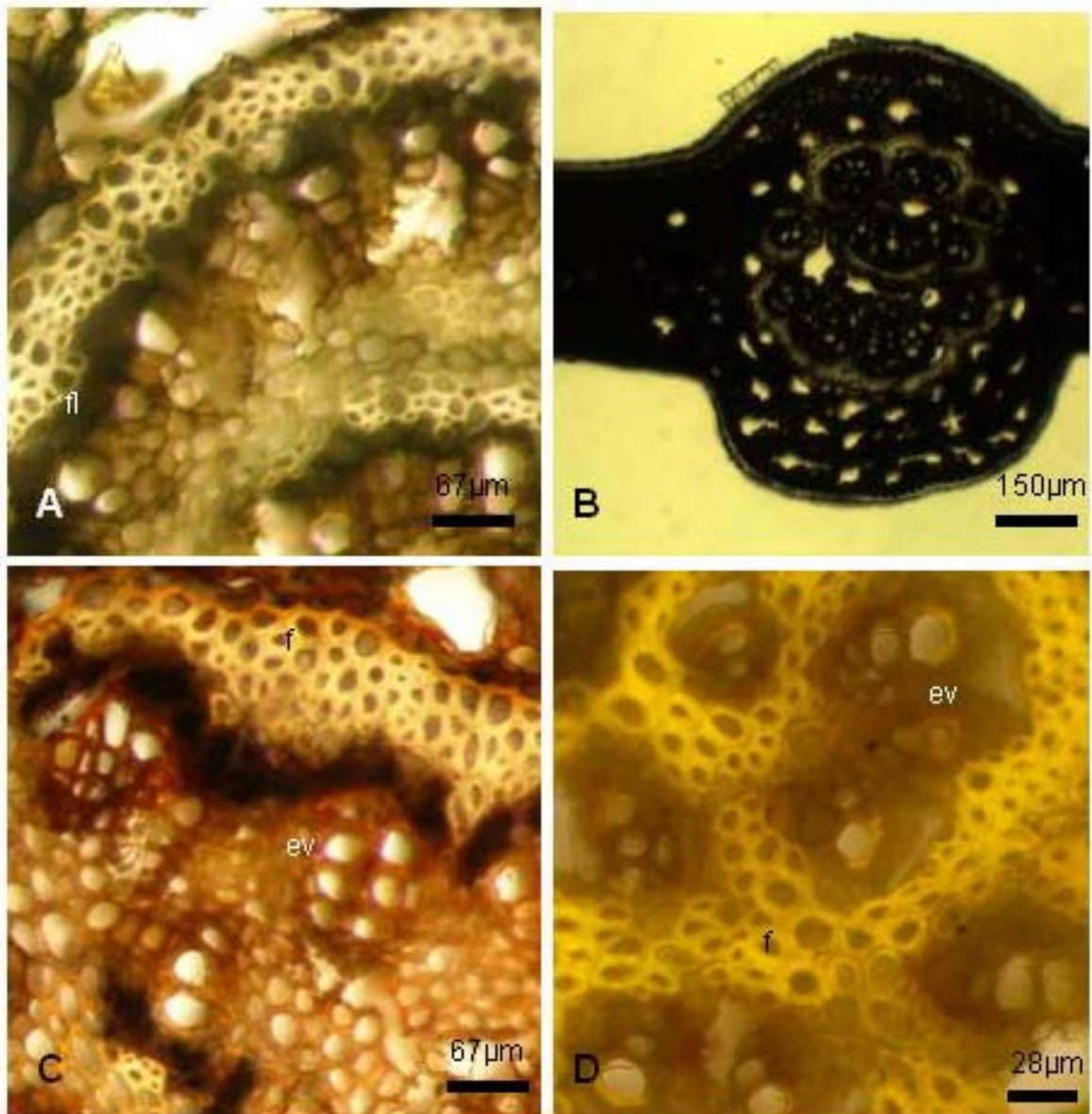
**Fig. 22.** Testes histoquímicos I. **A:** *Clusia gardneri* em azul de metileno mostrando ausência de celulose na cutícula da face adaxial (cd). **B:** *Clusia nemorosa* em azul de metileno mostrando ausência de celulose na cutícula da face abaxial (cb). **C:** *Clusia insignis* em azul de metileno não evidenciando celulose nas fibras dos elementos condutores (f). **D:** *Clusia burchellii* em reagente Steinmetz evidenciando compostos lipofílicos na cutícula da face adaxial (cd) e no parênquima paliçádico (pp). **E:** *Clusia nemorosa* em sudan III evidenciando compostos lipofílicos na cutícula da face adaxial (cd) e no parênquima paliçádico (pp). **F:** *Clusia criuva* em sudan IV evidenciando reação positiva para compostos lipofílicos no tecido floemático (fl) e elementos de vaso (ev).



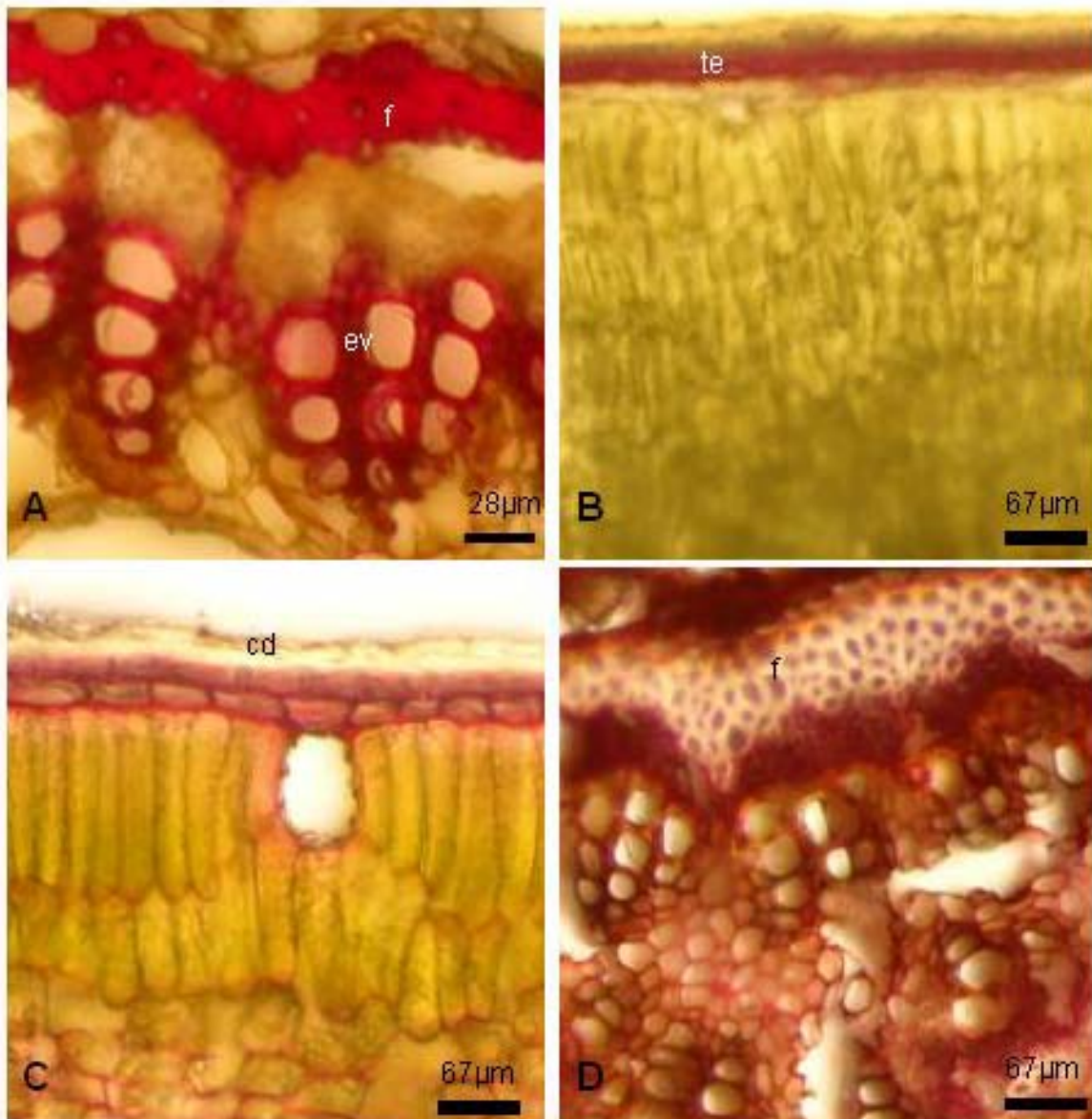
**Fig. 23.** Testes histoquímicos II. **A:** *Clusia gardneri* em sudan IV, indicando compostos lipofílicos presentes no látex no interior dos ductos secretores. **B:** *Clusia gardneri* em sudan IV apresentando compostos lipofílicos presentes na cutícula das faces adaxial (cd) e abaxial (cb) e no látex nos parênquimas paliçádico (pp) e lacunoso (pl). **C:** *Clusia insignis* com detecção de açúcares redutores na epiderme das faces adaxial (ed) e abaxial (eb) e nos parênquimas paliçádico (pp) e lacunoso (pl). **D:** *Clusia nemorosa* com reação positiva para açúcares redutores nos elementos condutores do floema (fl). **E:** *Clusia gardneri* com reação positiva para açúcares redutores na epiderme das faces adaxial (ed) e abaxial (eb); nota-se a presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas (d). **F:** *Clusia gardneri* em maior aumento evidenciando a epiderme da face abaxial (eb).



**Fig. 24.** Testes histoquímicos III. **A:** *Clusia fluminensis* com reação positiva para açúcares redutores na epiderme da face adaxial (ed). **B:** *Clusia nemorosa* em reagente de Steinmetz evidenciando grãos de amido (am) na bainha amilífera. **C:** *Clusia insignis* em cloreto de zinco iodado evidenciando grãos de amido (am) no tecido parênquimático acima da epiderme da face abaxial na região da nervura principal. **D:** *Clusia gardneri* em lugol evidenciando grãos de amido (am) no tecido parênquimático circundante aos elementos condutores. **E:** *Clusia nemorosa* em dicromato de potássio evidenciando compostos fenólicos na epiderme das faces adaxial (ed) e abaxial (eb) e nos tecidos parênquimáticos paliádico (pp) e lacunoso (pl). **F:** *Clusia insignis* em dicromato de potássio em maior aumento mostrando reação positiva para compostos fenólicos no tecido parênquimático (tp) e epiderme da face abaxial (eb).



**Fig. 25.** Testes histoquímicos IV. **A:** *Clusia criuva* em sulfato ferroso com formalina evidenciando reação positiva para compostos fenólicos no tecido floemático (fl). **B:** *Clusia insignis* em sulfato de ferro. **C:** *Clusia criuva* em cloreto de zinco iodado evidenciando lignina nas fibras (f) e elementos de vaso (ev). **D:** *Clusia lanceolata* em sulfato de anilina evidenciando lignina nas fibras (f) e elementos de vaso (ev).



**Fig. 26.** Testes histoquímicos V. **A:** *Clusia insignis* em floroglucinol clorídrico apresentando reação positiva para lignina nas fibras (f) e elementos de vaso (ev). **B:** *Clusia burchellii* em floroglucinol clorídrico evidenciando lignina no tecido esclerenquimático (te). **C:** *Clusia insignis* em vermelho de rutênio evidenciando ausência de pectina na cutícula da face adaxial (cd). **D:** *Clusia criva* em vermelho de rutênio evidenciando ausência de pectina nas fibras (f).

## CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO EPIDÉRMICA DA LÂMINA FOLIAR DE ESPÉCIES DE *CLUSIA* (CLUSIACEAE)

**RESUMO:** A face adaxial da epiderme, em vista frontal, é dotada apenas de células epidérmicas comuns, de forma e tamanho variáveis, dispostas irregularmente, de modo geral são poligonais, tendo de 4-6 lados, mais freqüentemente 5, e suas paredes são retas e espessas. As células epidérmicas comuns da face abaxial são um pouco menores, com paredes menos espessas. As espécies estudadas são hipoestomáticas, ocorrendo estômatos do tipo paracítico com células-guarda reniformes, apresentando distribuição irregular, densidades distintas e formas que variam de circular a elíptica. As células epidérmicas comuns adjacentes ao aparelho estomático apresentam arranjo radial em torno do mesmo, e suas paredes são delgadas e levemente curvas. Podem ocorrer estômatos geminados. A densidade é inversamente proporcional ao comprimento estomático, independente da espécie ou da condição ambiental na qual se encontra. Os padrões de deposição das ceras epicuticulares são distintos entre as espécies, Ambas as superfícies apresentaram o mesmo padrão de deposição de ceras epicuticulares, sendo classificadas como camadas fissuradas, crostas ou grânulos, diferindo também no volume, saliência e posição dos depósitos de ceras. Fibrilas nas paredes das células subsidiárias foram observadas em *C. aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. criuva* e *C. hilariana*, em todas essas espécies a disposição das fibrilas é radial em relação ao ostíolo. O espessamento e a ornamentação das paredes das células subsidiárias variam de acordo com a espécie, *C. burchellii*, *C. fluminensis* e *C. spiritu-sanctensis* são desprovidas de espessamento; *C. insignis*, *C. marizii* e *C. nemorosa* apresentam espessamento, mas sem ornamentação; presença de espessamento com leve ornamentação ocorre em *C. intermedia*, *C. lanceolata* e *C. parviflora*; as espécies com média a muita ornamentação são *C. aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. hilariana*. As células-guarda podem apresentar espessamento nas paredes ventrais em contato com o ostíolo, isto ocorre em *C. aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. hilariana*, *C. insignis*, *C. intermedia*, *C. lanceolata*, *C. parviflora* e *C. spiritu-sanctensis*. As características observadas em ambas as superfícies podem ser utilizadas para a distinção das espécies em estágio vegetativo.

**Palavras-chave:** cera epicuticular, densidade estomática, Guttiferae, micromorfologia.

**Agradecimentos:** Ao Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA (Brasília - DF) pela utilização do programa Image Pro-Plus e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB pelo apoio material e técnico.

## Introdução

Jones (1998) afirma que os estômatos foram evolutivamente selecionados para promover meios de controle da perda hídrica e das trocas gasosas, auxiliando no controle tanto da transpiração como da fotossíntese.

As características dos estômatos podem ser vistas sob diferentes perspectivas, e serem utilizadas em estudos de ecologia, evolução, fisiologia, morfologia e taxonomia. A função dessas células especializadas e, provavelmente a sua distribuição, tem papel importante na evolução e conquista terrestre das plantas (Croxdale, 2000).

A folha é um dos órgãos que melhor reflete as variações estruturais tanto de origem genética como ambiental. Apesar da uniformidade anatômica deste órgão ser grande entre as espécies de *Clusia*, muitas de suas características internas são utilizadas para a diferenciação das espécies (Solereider, 1908). A análise microscópica da superfície da lâmina foliar pode ser mais uma ferramenta na determinação das diferentes espécies do gênero *Clusia* de maneira mais precisa que somente a utilização dos caracteres morfológicos externos. Segundo Medina *et al.* (2004), a folha representa mais um parâmetro que pode ser utilizado tanto na taxonomia das espécies como no entendimento sobre mecanismos de adaptação ao ambiente.

Neste trabalho foram estudadas 14 espécies do gênero, coletadas em afloramento rochoso na Mata Atlântica (*Clusia aemygdioi*, *C. arrudae*, *C. intermedia*, *C. marizii* e *C. spiritu-sanctensis*), na Restinga (*C. fluminensis*, *C. hilariana*, *C. lanceolata* e *C. parviflora*), em mata de galeria no Cerrado (*C. burchellii*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. nemorosa*) e na Floresta Amazônica (*C. insignis*), sendo que um dos objetivos é relacionar as dimensões lineares e a área do estômato com as respectivas densidades.

Um segundo objetivo deste trabalho é apresentar uma caracterização mais precisa das estruturas da superfície foliar com o uso da microscopia eletrônica de varredura, visando uma melhor análise dos aparelhos estomáticos e, também a compreensão dos padrões diferenciados de deposição de ceras.



## Material e Métodos

A epiderme da região mediana das folhas das 14 espécies analisadas foi obtida com solução de Franklin (1946 - *apud* Kraus & Arduin, 1997) em estufa 40°C em um período de 24h-48h até a separação da mesma, a retirada do restante do mesofilo foi feita sob lupa com auxílio de pincel fino.

Os fragmentos de epiderme foram corados com azul de metileno 1% aquoso e bórax (Langeron, 1949) por 5min, desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila e montadas entre lâmina e lamínula em resina sintética (Paiva *et al.*, 2006). Para verificar possíveis alterações nas dimensões celulares devido ao preparo das lâminas, foram feitas comparações com segmentos paradérmicos feitos à mão livre e sem qualquer tratamento.

Para cada uma das cinco folhas de cada espécie, foram escolhidos, aleatoriamente, cinco campos de 1mm<sup>2</sup> de área. Para cada campo fez-se a quantificação dos estômatos para a obtenção da densidade estomática e escolheu-se, também aleatoriamente, um estômato para a medição de seus comprimento e largura máximos (ostíolo aberto), totalizando 25 medidas para cada espécie.

A partir das medições feitas, obteve-se a razão comprimento/largura e a área do estômato, considerando-o como uma elipse (área =  $\pi * \text{comprimento} * \frac{1}{2} * \text{largura} * \frac{1}{2}$ ). As variáveis densidade estomática, comprimento, largura e área foram submetidas à transformação logarítmica para alcançar a normalidade e mesma magnitude dos dados, essa transformação não foi necessária para a variável comprimento/largura.

As medições de comprimento e largura máximos do estômato, bem como a quantificação por unidade de área foram realizadas com auxílio do programa de análise de imagens IMAGE-PRO<sup>®</sup>PLUS do Laboratório de Produtos Florestais, IBAMA (Brasília-DF).

As análises estatísticas foram realizadas com o programa “R: A Language and Environment for Statistical Computing (2006)”. Os resultados foram considerados significativos a nível de 5%. A análise de variância (ANOVA) hierárquica foi utilizada em todas as variáveis para verificar onde ocorre maior variação – dentro ou entre as espécies. A hipótese nula testada foi: não existe diferença nas dimensões e densidades estomáticas entre as espécies estudadas. Também foram feitas análises

de Regressão Linear isoladas tendo a densidade estomática como variável dependente e o restante das variáveis como independentes.

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi feita para todas as espécies, mas para as espécies que foram enviadas fixadas e preservadas em etanol não foi possível a visualização dos depósitos de ceras epicuticulares. A fixação específica foi feita com solução fixadora Karnovsky (Bozzola & Russel, 1992) modificada (2% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 a 0,05M) por 12h, e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 1h.

Os tecidos fixados foram desidratados em série etílica crescente até a saturação (etanol 100%), secos ao ponto crítico (Balzers CPD 30), montados em porta espécimen e cobertos com ouro (Balzers SCD 050). O exame do material foi feito em microscópio eletrônico de varredura JEOL JEM 840A a 10 KV. As fotografias foram feitas em máquina digital a partir do monitor do microscópio e a classificação e terminologia foram feitas de acordo com Barthlott *et al.* (1998).

Para verificar possíveis deformações do material devido à fixação e desidratação, algumas amostras foram simplesmente secas ao ar, montadas, cobertas com ouro e examinadas.

## **Resultados - Estudos Paradérmicos**

A face adaxial da epiderme, em vista frontal, é dotada apenas de células epidérmicas comuns, de forma e tamanho variáveis, dispostas irregularmente. De modo geral são poligonais, tendo de 4-6 lados, mais freqüentemente 5 e suas paredes são retas e espessas (Fig. 27a). As células epidérmicas comuns da face abaxial são semelhantes àsquelas da face adaxial, embora um pouco menores, com paredes igualmente retas e menos espessas (Figs. 27-30).

Todas as espécies estudadas são hipoestomáticas, ocorrendo estômatos do tipo paracítico com células-guarda reniformes (Figs. 27b, 27c, 27d-30), esta classificação seguiu Van Cotthem (1970), que reformulou a antiga classificação feita por Vesque (1893, *apud* Schneider, 1985), na qual os estômatos eram considerados rubiáceos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras desidratadas e diafanizadas com aquelas retiradas à mão livre e sem qualquer tratamento.

As células epidérmicas comuns adjacentes ao aparelho estomático apresentam arranjo radial em torno do mesmo, e suas paredes são delgadas e levemente curvas (Figs. 27b, 27c, 27d-30), em *C. burchellii* (Fig. 27d) essas células apresentam forma retangular. Os estômatos possuem distribuição irregular e formas que variam de circular a elíptica (Figs. 27b, 27c, 27d-30), podem ocorrer estômatos geminados (Fig. 28a).

As células-guarda podem apresentar espessamento nas paredes ventrais em contato com o ostíolo, isto ocorre em *C. aemygdioi* (Fig. 27b), *C. arrudae* (Fig. 27c), *C. fluminensis* (Fig. 28b), *C. gardneri* (Fig. 28c), *C. hilariana* (Fig. 28d), *C. insignis* (Fig. 29a), *C. intermedia* (Fig. 29b), *C. lanceolata* (Fig. 29c), *C. parviflora* (Fig. 30b) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 30c).

Uma outra característica distinta entre as espécies é a presença de ornamentação nas paredes das células subsidiárias, sendo mais proeminente em *C. aemygdioi* (Fig. 27b). Esta ornamentação não ocorre em: *C. burchellii* (Fig. 27d), *C. fluminensis* (Fig. 28b), *C. insignis* (Fig. 29a), *C. marizii* (Fig. 29d), *C. nemorosa* (Fig. 30a) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 30c).

Com base na razão comprimento/largura (Tab. 9), foram calculados 3 intervalos para a classificação das formas dos estômatos: 1,09 – 1,75 (circular), 1,76 – 2,41 (intermediário) e 2,42 – 3,07 (elíptico). A maioria das espécies possui estômatos circulares: *C. aemygdioi* (Fig. 27b), *C. burchellii* (Fig. 27d), *C. fluminensis* (Fig. 28b), *C. gardneri* (Fig. 28c), *C. insignis* (Fig. 29a), *C. lanceolata* (Fig. 29c), *C. nemorosa* (Fig. 30a) e *C. parviflora* (Fig. 30b). As espécies com forma intermediária são: *C. arrudae* (Fig. 27c), *C. intermedia* (Fig. 29b) e *C. marizii* (Fig. 29d). As espécies com estômatos elípticos são: *C. criuva* (Fig. 28a), *C. hilariana* (Fig. 28d) e *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 30d).

O intervalo de comprimento é  $10,90 \pm 1,21 \mu\text{m}$  –  $33,78 \pm 2,28 \mu\text{m}$  (Tab. 9), sendo os estômatos mais curtos presentes em *C. burchellii* (Fig. 27d) e os mais alongados em *C. hilariana* (Fig. 28d); em relação à largura, o intervalo é de  $9,14 \pm 1,03 \mu\text{m}$  –  $21,67 \pm 2,85 \mu\text{m}$  (Tab. 9), *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 30c) apresenta os estômatos mais estreitos e *C. nemorosa* (Fig. 30a) os mais largos.

A área estomática varia entre as espécies (Tab. 9), *C. burchellii* (Fig. 27d) apresenta a menor área –  $86,87 \pm 17,58 \mu\text{m}^2$ , e *C. nemorosa* (Fig. 30a), a maior área

475,63±106,23µm<sup>2</sup>. As densidades também são distintas entre as espécies (Tab. 9), *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 30c) possui a menor concentração de estômatos por unidade de área – 105,75±10,0 estômatos/mm<sup>2</sup>, e *C. criuva* (Fig. 28a) a maior concentração – 233,56±28,62 estômatos/mm<sup>2</sup>.

**Tab. 9.** Médias e desvios-padrões de comprimento e largura (µm), razão comprimento/largura, área (µm<sup>2</sup>) e densidade (estômatos/mm<sup>2</sup>) das espécies estudadas.

Espécie	Comprimento	Largura	Comprimento/Largura	Área	Densidade	Forma
<i>Clusia aemygdioi</i>	16,55±1,26	10,73±1,33	1,56±0,17	140,06±23,46	200,46±12,41	circular
<i>Clusia arrudae</i>	17,82±1,44	10,37±2,21	1,79±0,38	146,28±38,44	137,01±15,51	intermediária
<i>Clusia burchellii</i>	10,90±1,21	10,08±1,20	1,09±0,12	86,87±17,58	195,86±11,72	circular
<i>Clusia criuva</i>	26,88±2,75	9,83±0,75	2,74±0,24	208,39±32,78	233,56±28,62	elíptica
<i>Clusia fluminensis</i>	22,38±1,61	18,19±1,42	1,23±0,11	320,19±38,61	205,06±15,75	circular
<i>Clusia gardneri</i>	21,73±2,11	15,96±1,61	1,37±0,14	273,82±47,71	143,91±14,48	circular
<i>Clusia hilariana</i>	33,78±2,28	11,08±1,19	3,07±0,37	294,74±44,74	146,21±13,10	elíptica
<i>Clusia insignis</i>	16,28±1,23	12,48±1,27	1,38±0,18	159,57±19,34	225,75±20,46	circular
<i>Clusia intermédia</i>	25,29±2,13	11,35±1,21	2,24±0,21	226,62±39,35	222,53±13,68	intermediária
<i>Clusia lanceolata</i>	25,23±2,97	18,29±2,28	1,38±0,10	366,54±81,59	166,44±12,87	circular
<i>Clusia marizii</i>	31,21±4,00	15,01±2,65	2,10±0,22	374,39±109,46	146,67±23,34	intermediária
<i>Clusia nemorosa</i>	27,66±2,81	21,67±2,85	1,28±0,09	475,63±106,23	218,85±14,25	circular
<i>Clusia parviflora</i>	17,59±2,44	11,42±1,63	1,55±0,15	160,16±40,70	215,63±18,50	circular
<i>Clusia spiritu-sanctensis</i>	25,07±2,66	9,14±1,03	2,76±0,27	181,23±35,01	105,75±10,00	elíptica

Como a variação dos dados entre as espécies foi maior que dentro de cada espécie, foi possível realizar as análises de Regressão para todas as variáveis ( $P < 2,2 \times 10^{-16}$ ).

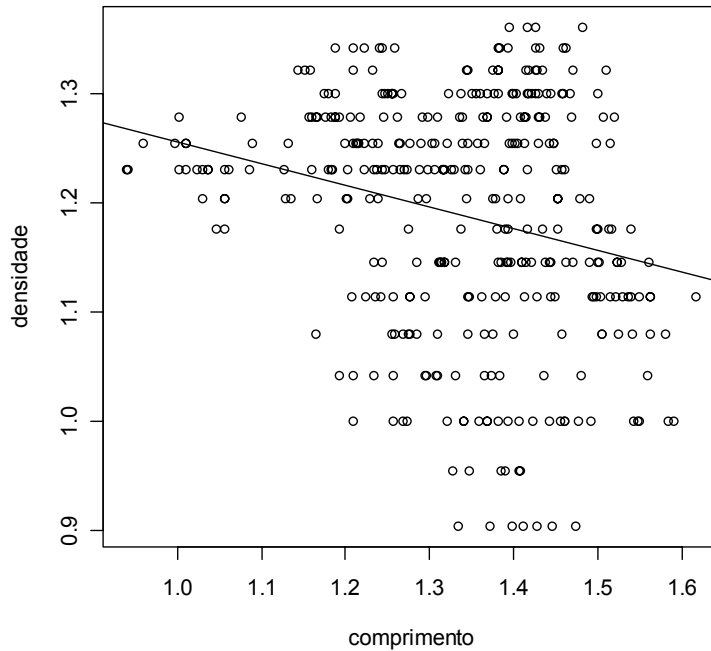
A regressão linear entre densidade (d) e comprimento (c) estomáticos (Graf. 1) mostrou-se significativa ( $P = 3,52 \times 10^{-6}$ ) e inversamente proporcional.

A regressão linear entre densidade e largura (L) estomáticas (Graf. 2) mostrou-se significativa ( $P = 0,02$ ) e diretamente proporcional.

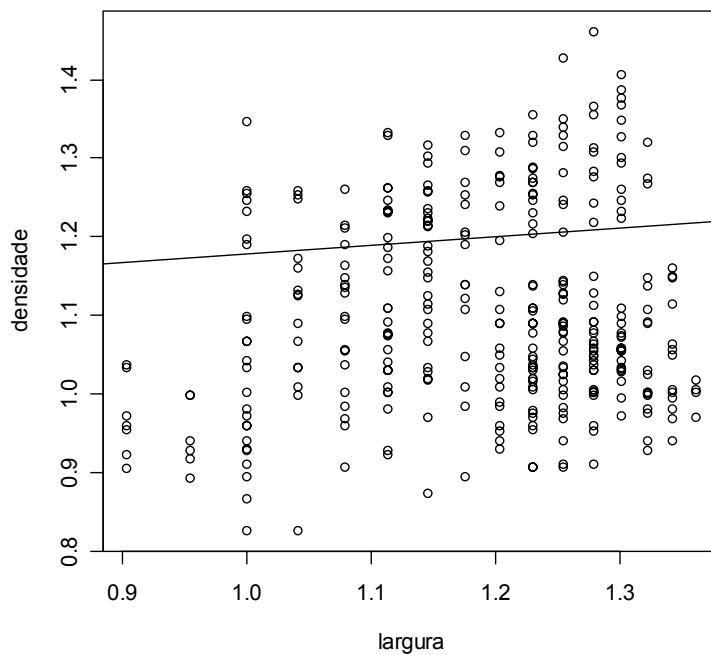
A regressão linear entre densidade e razão comprimento/largura (Graf. 3) também foi significativa ( $P = 2,64 \times 10^{-10}$ ) e inversamente proporcional.

A regressão linear entre densidade e área estomáticas não foi significativa ( $P = 0,14$ ).

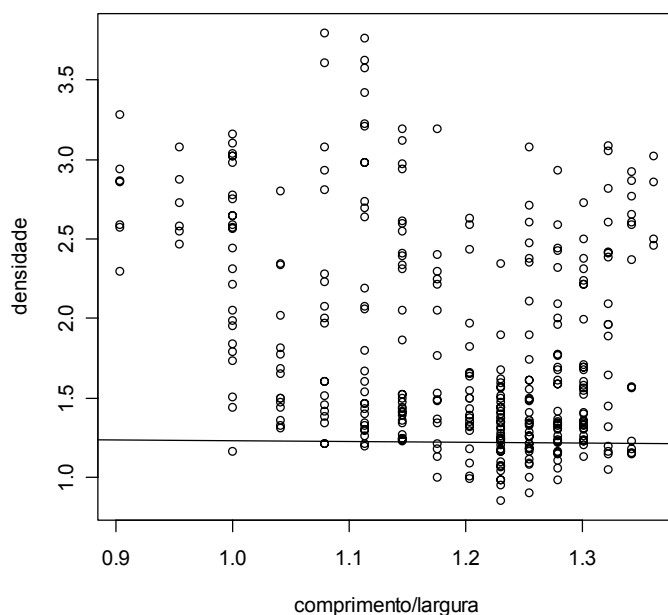
**Graf. 1.** Regressão linear entre comprimento ( $\mu\text{m}$ ) e densidade (estômatos/ $\text{mm}^2$ ) dos estômatos. As variáveis estão log-transformadas, sendo  $r^2$  de 0,76, e a equação  $d = -0,19c + 1,46$ .



**Graf. 2.** Regressão linear entre largura ( $\mu\text{m}$ ) e densidade (estômatos/ $\text{mm}^2$ ) dos estômatos. As variáveis estão log-transformadas, sendo  $r^2$  de 0,64, e a equação  $d = 0,1L + 1,07$ .



**Graf. 3.** Regressão linear entre comprimento/largura e densidade (estômatos/mm<sup>2</sup>) dos estômatos. A variável densidade está log-transformada, sendo r<sup>2</sup> de 0,81, e a equação  $d = -0,06c/L + 1,29$ .



## Resultados - Micromorfologia

Na análise em microscopia eletrônica de varredura (Figs. 31-35) foram observados os detalhes no aparelho estomático e os padrões de deposição das ceras epicuticulares. Não foram encontradas diferenças estruturais entre as amostras fixadas e desidratadas e aquelas simplesmente secas ao ar.

Ambas as superfícies apresentaram o mesmo padrão de deposição de ceras epicuticulares, sendo classificadas como camadas fissuradas, crostas ou grânulos; para cada tipo também foram analisados volume, saliência e posição dos depósitos de ceras.

O tipo camada fissurada só foi observado em *C. lanceolata* (Fig. 33a).

*Clusia aemygdioi* (Fig. 31a) apresenta crosta levemente plana, *C. fluminensis* (Fig. 31d) e *C. nemorosa* (Fig. 33b) possuem crostas planas; *C. hilariana* (Fig. 32b) tem crostas salientes e *C. intermedia* (Fig. 32d) apresenta crostas homogêneas em ondas.

O tipo de deposição em grânulos isodiamétricos foi predominante nas espécies oriundas do Cerrado, ocorrendo também em *C. insignis* (Fig. 32c), a qual é proveniente da Floresta Amazônica. *Clusia burchellii* (Fig. 31b) e *C. criuva* (Fig. 31c) apresentam

grânulos com volumes maiores e, *C. gardneri* (Fig. 32a) e *C. insignis* (Fig. 32c) possuem grânulos com volumes menores.

As formas dos aparelhos estomáticos confirmaram os dados encontrados nos estudos paradérmicos, variando de circular a elíptica. As principais diferenças entre as espécies foram: espessamento das paredes e ornamentação das fibrilas celulósicas das células subsidiárias, e o espessamento das paredes das células-guarda. Quando observadas, as fibrilas celulósicas das paredes das células subsidiárias têm disposição radial em relação ao ostíolo.

As espécies cujas paredes das células subsidiárias são desprovidas de espessamento são *C. burchellii* (Fig. 33e), *C. fluminensis* (Fig. 34b) e *C. spiritus-sanctensis* (Fig. 35e). As espécies que apresentam espessamento, mas sem ornamentação são *C. insignis* (Fig. 34e), *C. marizii* (Fig. 35b) e *C. nemorosa* (Fig. 35c), sendo o espessamento mais proeminente em *C. insignis* (Fig. 34e) e *C. nemorosa* (Fig. 35c). Presença de espessamento com leve ornamentação em *C. intermedia* (Fig. 34f), *C. lanceolata* (Fig. 35a) e *C. parviflora* (Fig. 35d). As espécies com média a muita ornamentação são *C. aemygdioi* (Fig. 33c), *C. arrudae* (Fig. 33d), *C. criuva* (Fig. 34a), *C. gardneri* (Fig. 34c) e *C. hilariana* (Fig. 34d).

O espessamento das paredes ventrais (em contato com o ostíolo) das células-guarda, visualizado em microscopia de luz, foi confirmado para todas as espécies citadas anteriormente, sendo mais destacado em *C. fluminensis* (Fig. 34b), *C. gardneri* (Fig. 34c) e *C. lanceolata* (Fig. 35a).

As características das ceras epicuticulares e dos aparelhos estomáticos são diferenciadas entre as espécies estudadas, desta maneira foi possível a confecção da seguinte chave.

1- Células subsidiárias com espessamento nas paredes.....	2
1'- Células subsidiárias sem espessamento nas paredes.....	6
2- Ornamentação nas paredes das células subsidiárias.....	3
2'- Ausência de ornamentação nas paredes das células subsidiárias.....	5
3- Depósito de cera em crostas planas.....	<i>C. aemygdioi</i>
3'- Depósito de cera em crostas salientes.....	<i>C. hilariana</i>
3''- Depósito de cera em crostas em ondas.....	<i>C. intermedia</i>
3'''- Depósito de cera em camada fissurada.....	<i>C. lanceolata</i>
3''''- Depósito de cera em grânulos.....	4
4- Estômatos circulares.....	<i>C. gardneri</i>
4'- Estômatos elípticos.....	<i>C. criuva</i>
5- Depósito de cera em crostas planas.....	<i>C. nemorosa</i>
5'- Depósito de cera em grânulos.....	<i>C. insignis</i>
6- Depósito de cera em crostas planas.....	<i>C. fluminensis</i>
6'- Depósito de cera em grânulos.....	<i>C. burchellii</i>

## Discussão e Conclusão

Vesque (1893) não aceitou a possibilidade de atribuir valor taxonômico aos tipos de estômatos, já que tipos idênticos podem ocorrer em famílias bastante distintas. No entanto, à medida que aumenta a quantidade de dados referentes a estômatos, mais autores se convencem do valor taxonômico dos mesmos (Van Cotthem, 1970).

Confirmando resultados de Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1983), neste gênero ocorrem estômatos somente na face abaxial da folha, apresentando arranjo paracítico, sendo que o primeiro autor faz referências a determinadas características do aparelho estomático, como posição das células subsidiárias em relação às células-guarda e ornamentação nas paredes de ambos os tipos celulares, que podem servir para fins taxonômicos.

Dunn *et al.* (1965) consideraram o tamanho dos estômatos nas dicotiledôneas um caráter pobre ou inconsistente, devido às variações nas dimensões provocadas pelo ambiente. No entanto, nesta análise a variação das dimensões e densidade



estomáticas foram distintas entre as espécies, independentemente se pertenciam ao mesmo ambiente, o que mostra uma maior importância da influência filogenética que do ambiente, sendo possível inclusive a separação das espécies pela presença e tipo de ornamentação nas paredes das células subsidiárias, e presença de espessamento nas paredes ventrais das células-guarda.

Com os resultados obtidos, as variações nas dimensões e densidade estomáticas foram maiores entre as espécies que dentro de uma mesma espécie, favorecendo, portanto a maior influência filogenética sobre a ambiental. Entretanto, Stace (1965) avaliou a influência dos fatores ambientais sobre a frequência estomática no gênero *Combretum*, e enfatizou que essa influência é mais relevante do que a filogênese. O mesmo autor chama a atenção para a variabilidade no tamanho dos estômatos, o que considera um caráter de relativa importância e de valor sistemático.

Não foi detectada diferença significativa entre a densidade estomática de ambos os sexos nas espécies estudadas, provavelmente porque as coletas foram realizadas durante o período de floração simultânea entre eles. No entanto, Machado (1980) observou que a frequência de estômatos por  $\text{mm}^2$  em *Clusia lanceolata* Cambess. é maior nos indivíduos femininos que nos masculinos. A autora levanta a hipótese de que tal circunstância esteja relacionada ao maior dispêndio de energia pelos indivíduos femininos na fase de formação dos frutos.

A regressão linear entre densidade e comprimento estomáticos mostrou-se significativa e inversamente proporcional, este resultado sugere um mecanismo de compensação, o que é verificado nitidamente em *C. insignis* e *C. lanceolata*; e também comprovado, inversamente, em *C. hilariana*, *C. marizii* e *C. spiritu-sanctensis* que possuem maiores comprimentos e baixas densidades, confirmando dados de Muenscher (1915), que afirmou que plantas com baixa densidade estomática geralmente possuem estômatos grandes, e aquelas com alta densidade possuem estômatos pequenos. Eckerson (1908), também relata uma relação inversamente proporcional entre quantidade e comprimento dos estômatos.

A regressão linear entre densidade e largura estomáticas mostrou-se significativa e diretamente proporcional. Enquanto que a regressão linear entre densidade e razão comprimento/largura também foi significativa, mas inversamente proporcional. Nas espécies estudadas, geralmente quanto maior a largura, o estômato

mostra-se mais circular, como ocorre em *C. nemorosa*, e inversamente em *C. criuva* e *C. spiritu-sanctensis*, que possuem estômatos mais estreitos e elípticos. Os dados referentes à razão comprimento/largura confirmam aqueles obtidos nas regressões anteriores e acrescentam que quanto mais circular for o estômato, maior será sua densidade, o que é comprovado em *C. aemygdioi*, *C. burchellii*, *C. insignis*, *C. nemorosa* e *C. parviflora*, e inversamente em *C. spiritu-sanctensis* que possui estômatos elípticos e em menor densidade.

A regressão linear entre densidade e área estomáticas não foi significativa ( $P=0,14$ ), portanto a variação da densidade por área não é significativamente diferente da variação aleatória. Segundo Eckerson (1908), a passagem de gases pelo estômato é dependente do comprimento, e não da área dessas estruturas, o que corrobora o resultado aqui obtido.

Com base nos resultados obtidos, é possível estabelecer relações entre as dimensões lineares do estômato (comprimento e largura) com as respectivas densidades, independente da espécie ou da condição ambiental na qual se encontra.

A evolução das técnicas de preparação de material biológico e o advento da microscopia eletrônica permitiram a observação e análise dos tecidos e células com diferentes capacidades de resolução (Souza, 1998). Os caracteres observados através da microscopia eletrônica de varredura são denominados micromorfológicos (Judd *et al.*, 1999).

A escolha do fixador tetróxido de ósmio, apesar de sua alta toxicidade, foi devido à preservação de estruturas celulares, pois penetra nos tecidos de maneira extremamente lenta, mas reage bastante rápido, promovendo uma fixação uniforme, portanto é um dos melhores fixadores para a técnica (Feder & O'Brien, 1968).

A presença ou ausência das fibrilas da parede das células subsidiárias pode ser utilizada para a distinção entre as espécies estudadas. Sack & Paolillo, Jr. (1983) afirmaram que a maioria das plantas com células-guarda com forma reniforme apresenta fibrilas da parede celular orientadas radialmente em relação ao ostíolo, sendo que essas fibrilas nem sempre estão presentes.

Estudos da micromorfologia foliar possibilitam a visualização das esculturas cerosas nas superfícies foliares com adaptações ao ambiente físico, auxiliando plantas com alta velocidade de transpiração na reflexão da luz e na impermeabilização da

epiderme tanto para reduzir as perdas de água quanto para auxiliar na defesa contra infecção por fungos (Salatino *et al.*, 1986).

O tipo camada fissurada só foi observado em *C. lanceolata*. Segundo Barthlott *et al.* (1998), tais fissuras podem ser resultantes da quebra das camadas de cera pela expansão da superfície epidérmica durante o crescimento do vegetal, o que leva à produção de ceras em taxas diferenciadas.

A maioria das espécies possui deposição de ceras em crostas, como *Clusia aemygdioi* que apresenta crosta levemente plana, *C. fluminensis* e *C. nemorosa* com crostas planas; *C. hilariana* tem crostas salientes e *C. intermedia* apresenta crostas homogêneas em ondas. Barthlott (1998) considera a deposição de ceras em crostas o tipo característico de plantas com folhas carnosas.

A deposição em grânulos isodiamétricos foi predominante nas espécies oriundas do Cerrado, ocorrendo também em *C. insignis*. *Clusia burchellii* e *C. criuva* apresentam grânulos com volumes maiores e, *C. gardneri* e *C. insignis* possuem grânulos com volumes menores.

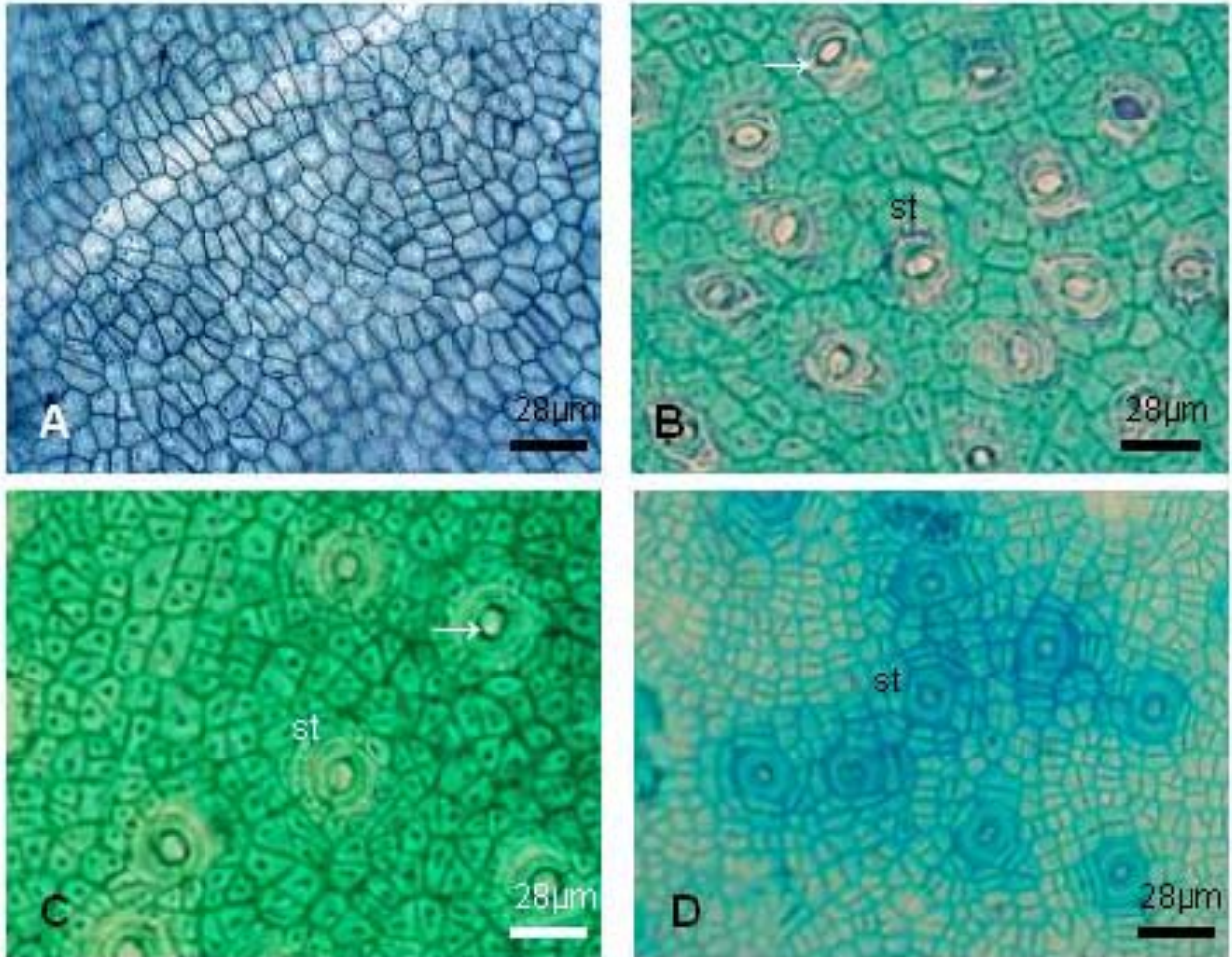
Por manter contato direto com o ambiente, a epiderme está sujeita a modificações estruturais em decorrência de vários fatores ambientais (Cutter, 1986a, 1986b). Medina *et al.* (2004) afirmam que a análise das ceras pode levar ao entendimento sobre mecanismos de adaptação ao ambiente. No entanto, não foram encontrados padrões de ceras ou aparelhos estomáticos típicos entre as espécies oriundas de um mesmo ambiente; ao contrário, foram evidenciadas características bastante divergentes em *C. criuva* e *C. nemorosa*, ambas oriundas de matas de galeria do Cerrado.

De acordo com Barthlott *et al.* (1998), as ceras que cobrem a cutícula foliar possuem grande diversidade química e ultraestrutural, sendo que a maioria possui significado taxonômico, além de apresentar importância ecológica na interação entre plantas e o ambiente. Medina *et al.* (2004) indicaram características da deposição das ceras epicuticulares úteis na taxonomia de algumas espécies do gênero *Clusia*, o que também foi observado neste trabalho.

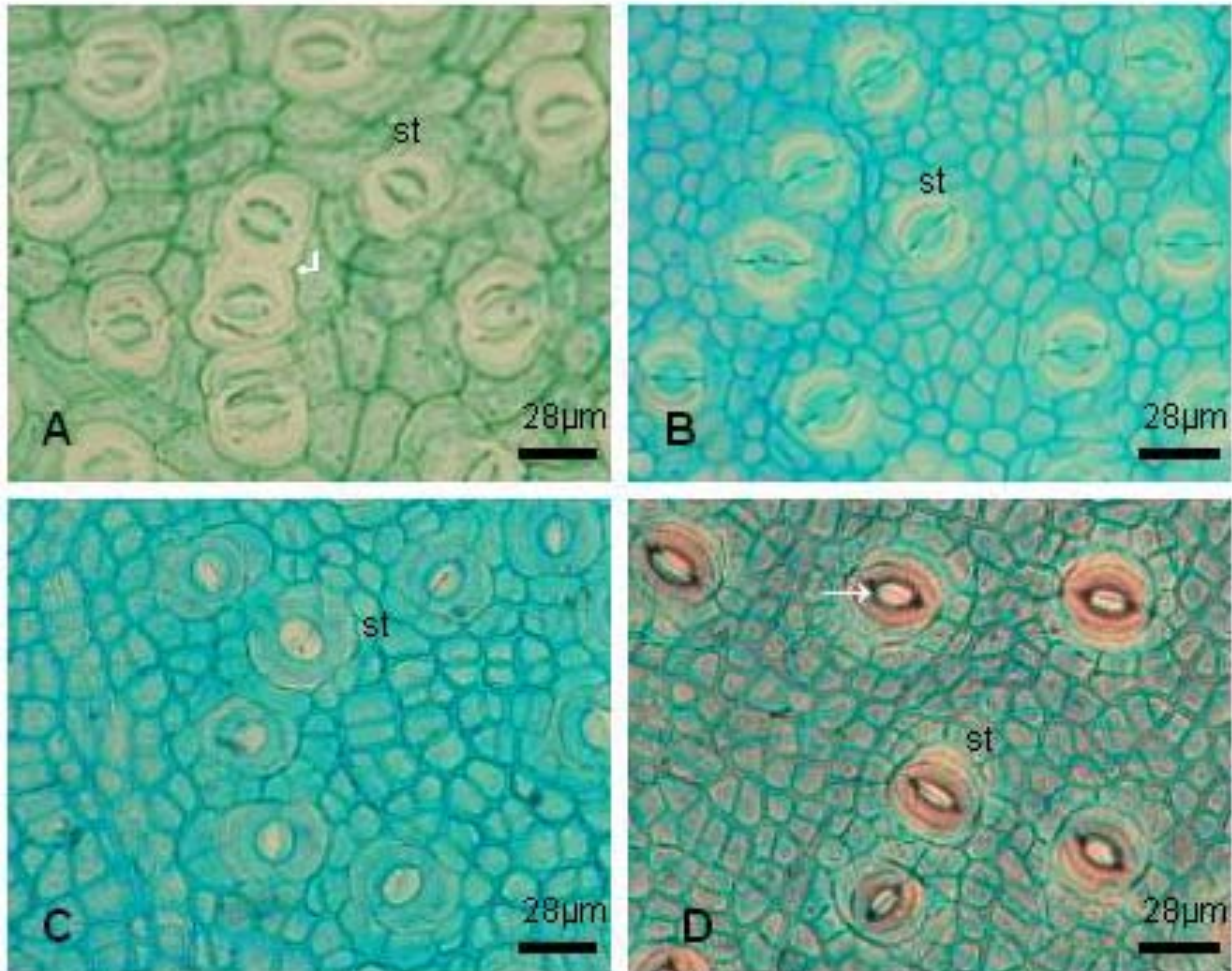
Denton (1994) concluiu que as análises das ceras epicuticulares são ferramentas úteis para a distinção entre as espécies de Crassulaceae estudadas pela autora. Yang & Lin (2005) elaboraram uma chave taxonômica com base na anatomia e

micromorfologia da epiderme foliar das espécies de *Schisandra*, afirmaram que as características da epiderme são constantes, não apresentando variações significativas entre populações da mesma espécie.

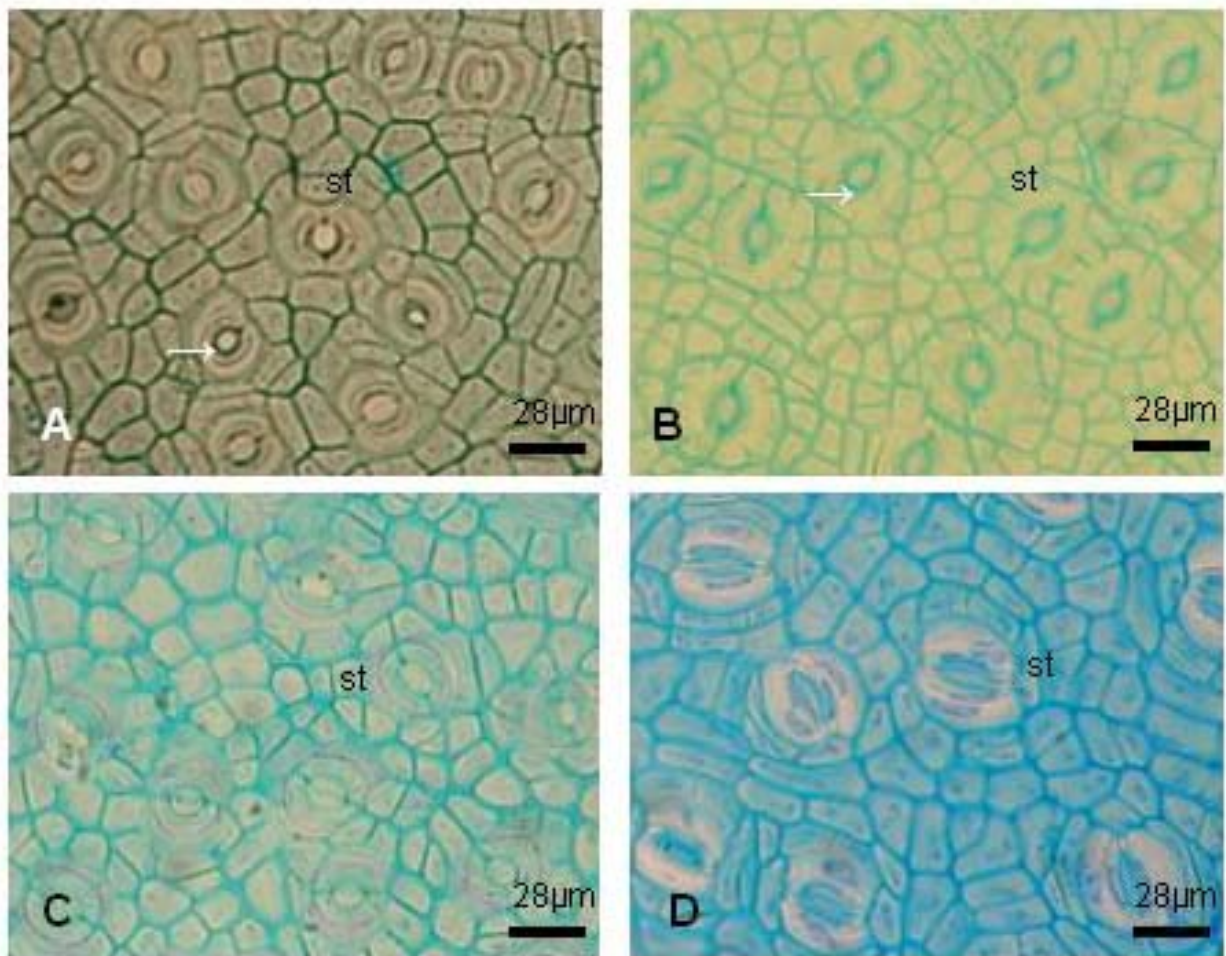
Neste trabalho, foi verificado que as características das ceras são diferenciadas entre as espécies, assim como os aparelhos estomáticos. Desta maneira foi possível a separação das espécies de acordo com essas características, proporcionando mais um parâmetro a ser utilizado na distinção entre as espécies do gênero *Clusia*.



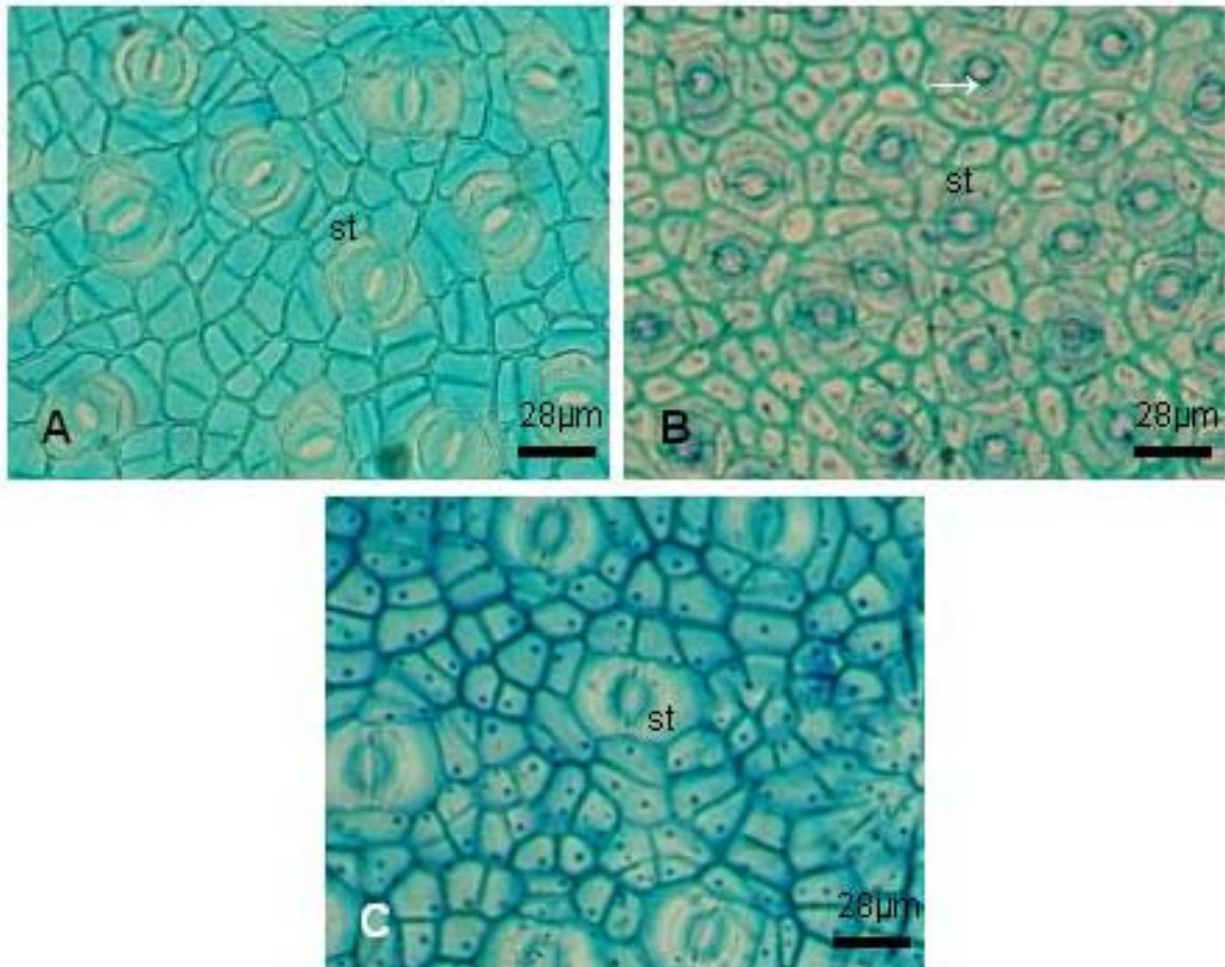
**Fig. 27.** Amostras paradérmicas evidenciando as células epidérmicas comuns (ec) e o arranjo paracítico e a distribuição irregular dos estômatos (st). **A:** Superfície adaxial de *Clusia parviflora* apresentando somente células epidérmicas comuns poligonais e dispostas irregularmente. **B:** Superfície abaxial de *Clusia aemygdioi* com estômatos circulares com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→) e ornamentação nas células subsidiárias (♦). **C:** *Clusia arrudae* com estômatos intermediários com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **D:** *Clusia burchellii* com estômatos tipicamente circulares e com a menor área entre as espécies, notam-se células comuns retangulares ao redor do aparelho estomático.



**Fig. 28.** Amostras paradérmicas da superfície abaxial I, evidenciando o arranjo paracítico e a distribuição irregular dos estômatos (st). **A:** *Clusia criuva* com estômatos elípticos e com a maior densidade entre as espécies, presença de estômatos geminados (↙). **B:** *Clusia fluminensis* com estômatos circulares com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **C:** *Clusia gardneri* com estômatos circulares com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **D:** *Clusia hilariana* com estômatos elípticos, bastante alongados e com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→).

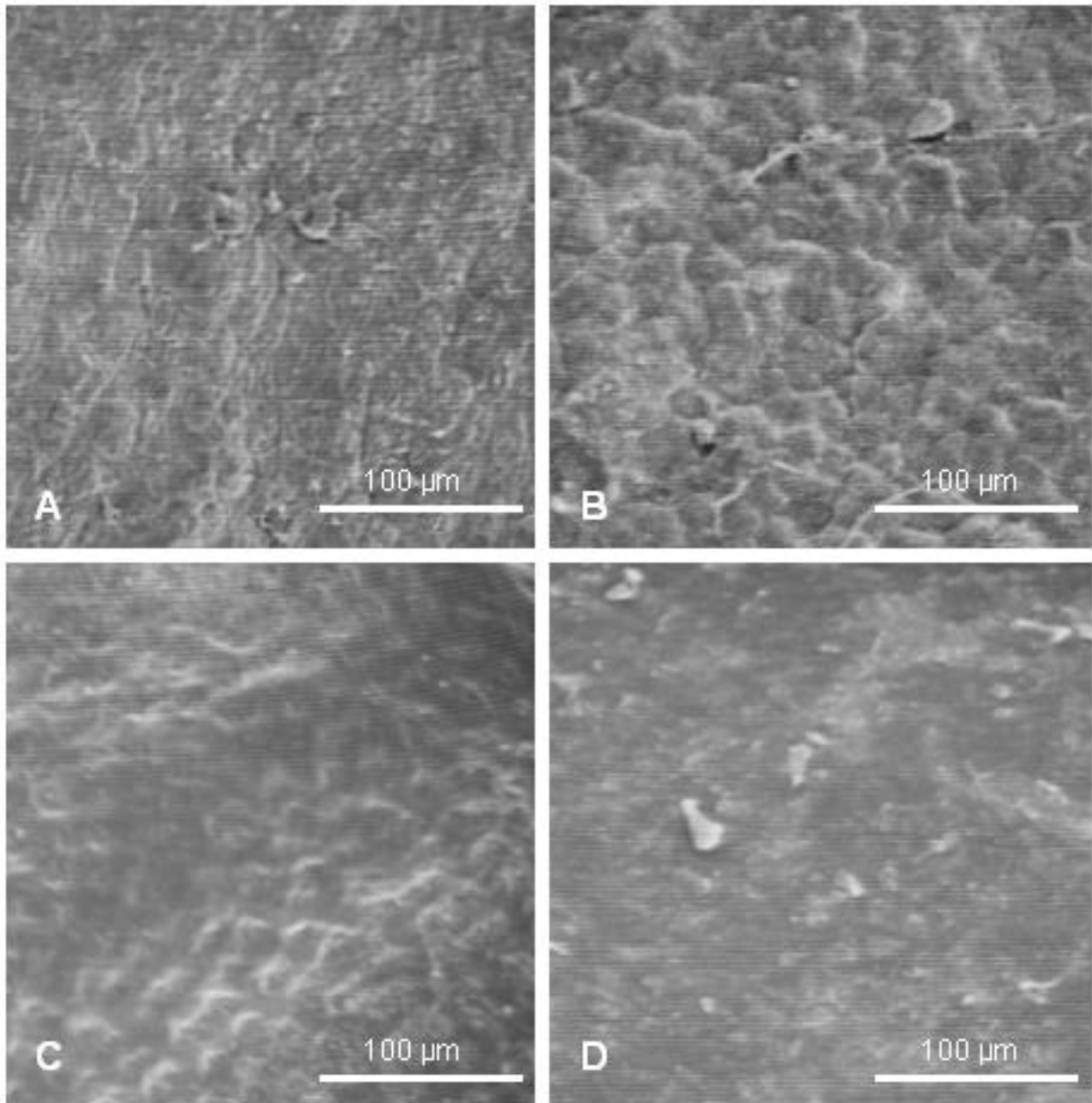


**Fig. 29.** Amostras parodérmicas da superfície abaxial II, evidenciando o arranjo paracítico e a distribuição irregular dos estômatos (st). **A:** *Clusia insignis* com estômatos circulares com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **B:** *Clusia intermedia* com estômatos de forma intermediária com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **C:** *Clusia lanceolata* com estômatos circulares. **D:** *Clusia marizii* com estômatos de forma intermediária.

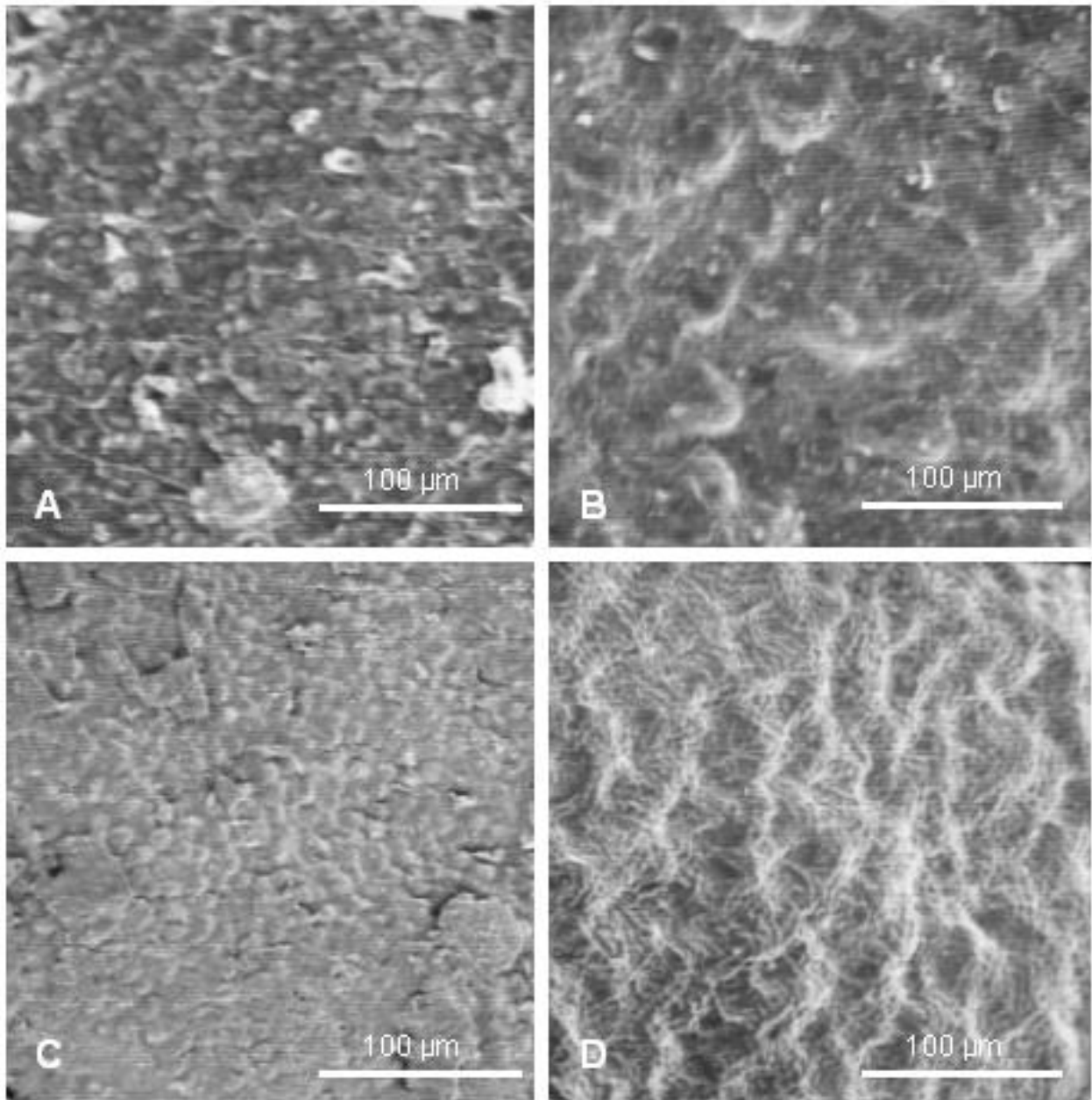


**Fig. 30.** Amostras paradérmicas da superfície abaxial III, evidenciando o arranjo paracítico e a distribuição irregular dos estômatos (st). **A:** *Clusia nemorosa* com estômatos circulares e com a maior área entre as espécies. **B:** *Clusia parviflora* com estômatos circulares e com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→). **C:** *Clusia spiritu-sanctensis* com estômatos elípticos, com a menor densidade entre as espécies e com espessamento nas paredes ventrais das células-guarda (→).

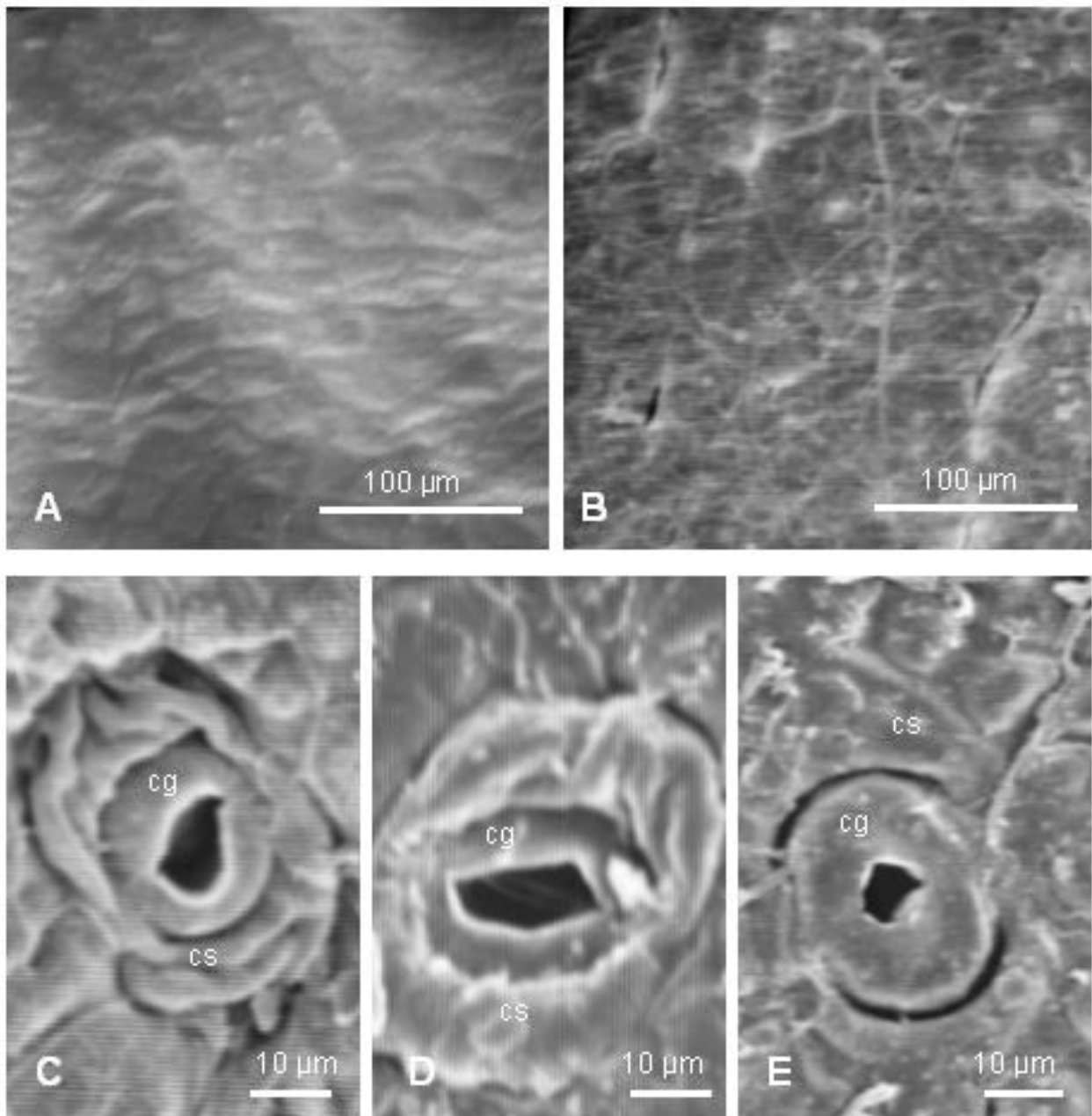




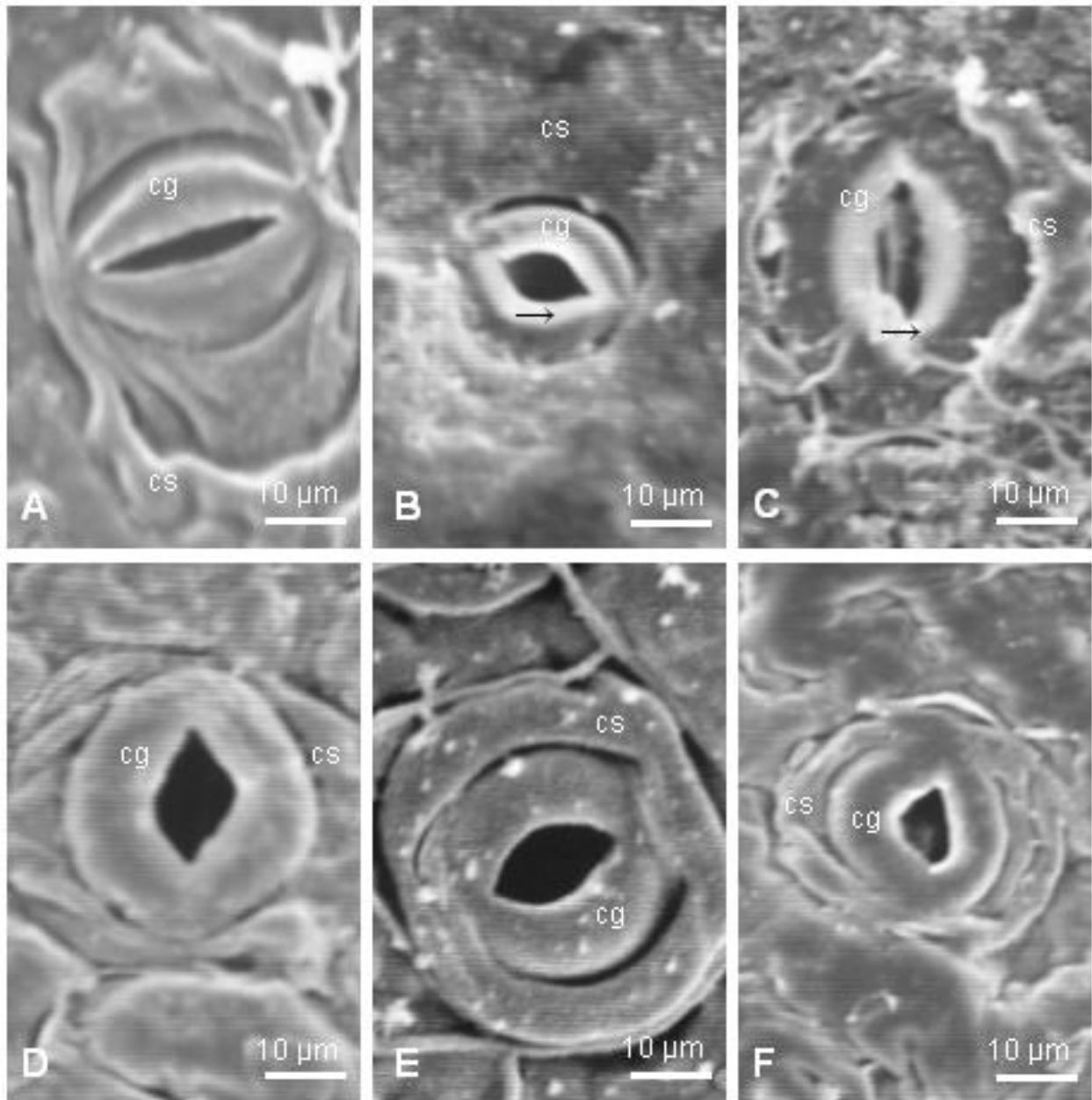
**Fig. 31.** Micromorfologia da superfície adaxial I, evidenciando o padrão de deposição das ceras epicuticulares. **A:** *Clusia aemygdioi* com crostas levemente planas. **B:** *Clusia burchellii* com grânulos volumosos. **C:** *Clusia criuva* com grânulos volumosos. **D:** *Clusia fluminensis* com crostas planas.



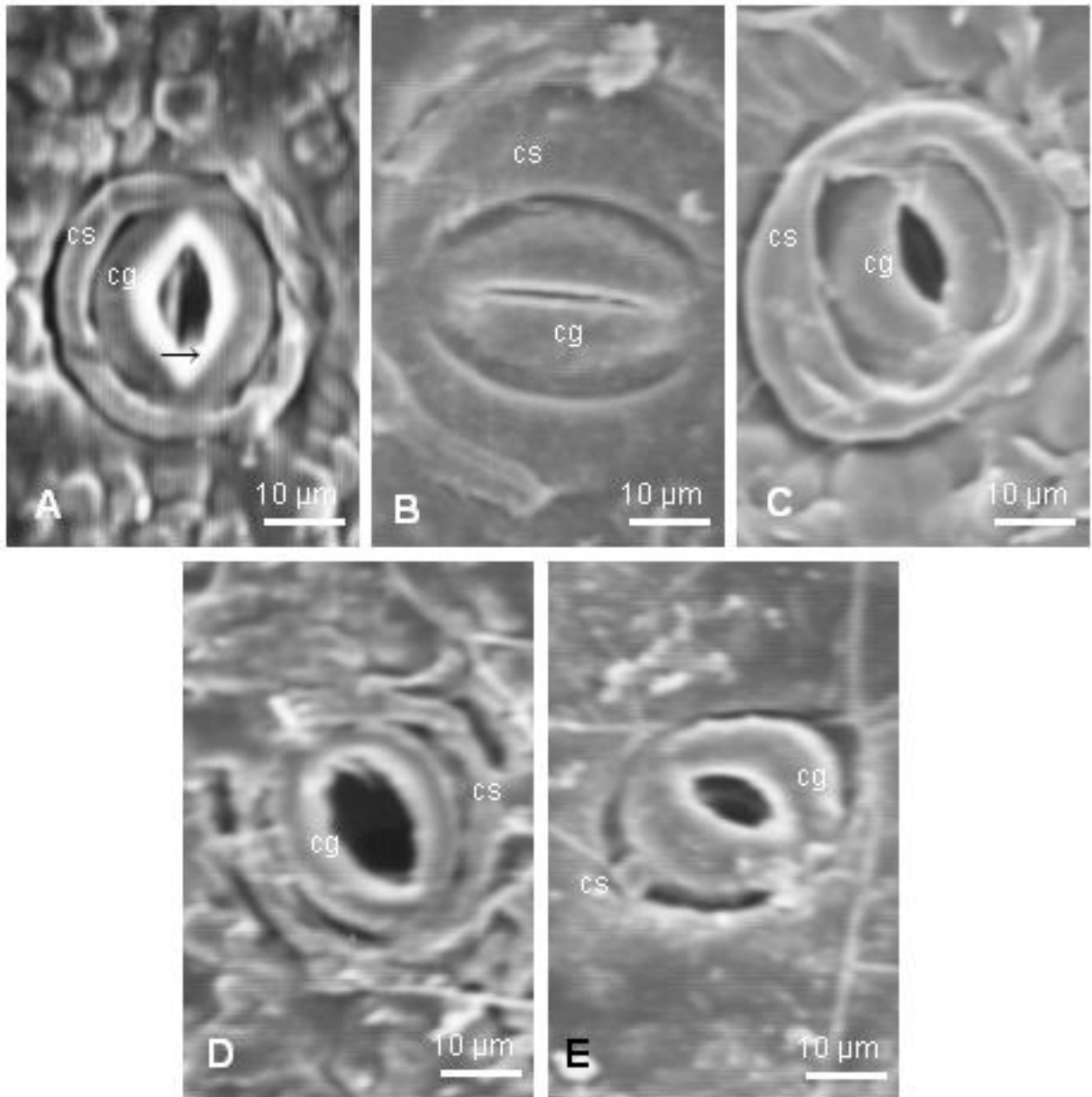
**Fig. 32.** Micromorfologia da superfície adaxial II, evidenciando o padrão de deposição das ceras epicuticulares. **A:** *Clusia gardneri* com grânulos com volumes menores. **B:** *Clusia hilariana* com crosta saliente. **C:** *Clusia insignis* com grânulos com volumes menores. **D:** *Clusia intermedia* com crosta homogênea em ondas.



**Fig. 33.** Micromorfologia de ambas as superfícies, evidenciando na superfície abaxial as células-guarda (cg) e subsidiárias (cs). **A:** *Clusia lanceolata* com deposição de ceras em camadas fissuradas. **B:** *Clusia nemorosa* com deposição de ceras em crostas planas. **C:** *Clusia aemygdioi* com células subsidiárias com muita ornamentação. **D:** *Clusia arrudae* com células subsidiárias com paredes espessadas e ornamentação média. **E:** *Clusia burchellii* desprovida espessamento nas paredes das células subsidiárias.



**Fig. 34.** Micromorfologia da superfície abaxial I, evidenciando as células-guarda (cg) e subsidiárias (cs). **A:** *Clusia criuva* com espessamento nas paredes das células subsidiárias com muita ornamentação. **B:** *Clusia fluminensis* desprovida de espessamento nas paredes das células subsidiárias, mas apresentando espessamento nas paredes ventrais (→) das células-guarda. **C:** *Clusia gardneri* com espessamento nas paredes das células subsidiárias com ornamentação média, e espessamento nas paredes ventrais (→) das células-guarda. **D:** *Clusia hilariana* com espessamento nas paredes das células subsidiárias com ornamentação média. **E:** *Clusia insignis* com denso espessamento nas paredes das células subsidiárias sem ornamentação. **F:** *Clusia intermedia* com leve espessamento nas paredes das células subsidiárias com pouca ornamentação.



**Fig. 35.** Micromorfologia da superfície abaxial II, evidenciando as células-guarda (cg) e subsidiárias (cs). **A:** *Clusia lanceolata* com leve espessamento nas paredes das células subsidiárias com pouca ornamentação, e espessamento nas paredes ventrais (→) das células-guarda. **B:** *Clusia marizii* com espessamento nas paredes das células subsidiárias sem ornamentação. **C:** *Clusia nemorosa* com denso espessamento nas paredes das células subsidiárias, mas sem ornamentação. **D:** *Clusia parviflora* com leve espessamento nas paredes das células subsidiárias com pouca ornamentação. **E:** *Clusia spiritu-sanctensis* desprovida de espessamento nas paredes das células subsidiárias.

### CAPÍTULO 3 - TIPO DE METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E SUA RELAÇÃO COM A ANATOMIA FOLIAR DE ESPÉCIES DE *CLUSIA* (CLUSIACEAE)

**RESUMO:** O gênero *Clusia* é caracterizado pela presença de espécies exclusivamente  $C_3$ , ou adaptadas a ambos os metabolismos  $C_3$ /CAM, ou ainda CAM exclusivas. Foi realizado um estudo comparativo entre 12 espécies do gênero, as espécies cuja via fixadora de carbono é apenas o ciclo de Calvin, plantas  $C_3$ , são *Clusia nemorosa* e *C. parviflora*; as espécies que apresentam metabolismo intermediário  $C_3$ /CAM são *C. aemygdioi*, *C. criuva*, *C. gardneri*, *C. intermedia*, *C. lanceolata* e *C. marizii*; as espécies com predomínio do metabolismo ácido das crassuláceas são *C. burchellii*, *C. fluminensis*, *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis*. O objetivo deste estudo foi identificar variações nas características anatômicas de acordo com o tipo de metabolismo fotossintético. Os tecidos presentes no mesofilo da lâmina foliar foram as principais estruturas influenciadas pelo metabolismo fotossintético. O mesofilo é muito mais espesso nas espécies CAM, de espessura intermediária nas espécies que realizam ambos os metabolismos e mais delgado nas espécies  $C_3$ . No entanto, a hipoderme apresenta-se mais espessa nas espécies  $C_3$  e intermediárias, sendo que a espécie que possui maior quantidade de camadas celulares (5-6) neste tecido é *C. parviflora*, uma planta  $C_3$ . Desta maneira, as células da hipoderme podem não ser suficientes para evitar a perda d'água em condições ambientais extremas, sendo necessária a presença de espessa cutícula, uma outra característica dessas espécies. Apesar da associação entre suculência e CAM sugerir adaptações a ambientes áridos, *Clusia* tem uma ampla distribuição tropical, não estando restrita a ambientes secos ou a hábito de epifitismo, o que leva a crer que todas as espécies *Clusia* têm um certo potencial genético a CAM.

**Palavras-chave:** estrutura foliar, fisiologia, Guttiferae, metabolismo  $C_3$  e CAM.

**Agradecimentos:** Ao Prof. Leonel da Silveira Lobo Sternberg (University of Miami) pela determinação dos tipos de metabolismo fotossintético e ao Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA (Brasília - DF) pela utilização do programa Image Pro-Plus

## Introdução

Plantas que utilizam apenas o ciclo de Calvin como via fixadora de carbono são denominadas C<sub>3</sub> (Raven *et al.*, 1996). Uma outra via fotossintética é o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), o qual é caracterizado pela absorção noturna de CO<sub>2</sub> através da abertura estomática, sendo que durante o dia, os estômatos estão fechados, e como consequência a demanda de evaporação do vapor d'água é baixa, desta maneira as plantas perdem menos água durante a assimilação de CO<sub>2</sub> (Ting *et al.*, 1985).

O ciclo de Calvin é iniciado quando o dióxido de carbono é ligado covalentemente a ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), o composto resultante é quebrado imediatamente formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA), a enzima responsável pelo processo é a RuBP carboxilase (Rubisco). O produto imediato do ciclo é o gliceraldeído 3-fosfato, com posterior síntese da glicose (Raven *et al.*, 1996).

As plantas consideradas CAM são aquelas cujas células são capazes de fixar dióxido de carbono no escuro via a enzima PEP carboxilase, formando o ácido málico que é armazenado nos vacúolos. Durante o período seguinte de luz, o ácido málico é descarboxilado e o dióxido de carbono é transferido para Rubisco no ciclo de Calvin (Raven *et al.*, 1996). Em relação as Clusiaceae, também há a síntese de ácido cítrico, com o posterior armazenamento nos vacúolos e descarboxilação no período seguinte de luz (Ting *et al.*, 1985; Borland *et al.*, 1998 e Herzog *et al.*, 1999).

Segundo Roberts *et al.* (1998), membros do gênero *Clusia* pertencem a um pequeno grupo de árvores dicotiledôneas que realizam tanto metabolismo C<sub>3</sub> quanto CAM. Haag-Kerwer *et al.* (1992) afirmaram que algumas espécies do gênero são capazes de expressar estas duas vias fotossintéticas, dependendo das condições ambientais. De acordo com Franco *et al.* (1990) esta flexibilidade no processo fotossintético possibilitou a dispersão geográfica deste gênero através dos trópicos. Existem evidências moleculares dentro do gênero para uma evolução independente desta flexibilidade no processo de fotossíntese (Vaasen *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo entre 12 espécies do gênero (*Clusia aemygdioi*, *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. fluminensis*, *C. gardneri*, *C. hilariana*, *C. intermedia*, *C. lanceolata*, *C. marizii*, *C. nemorosa*, *C. parviflora* e *C. sipiritu-sanctensis*)

com objetivo de verificar possíveis influências do metabolismo fotossintético na expressão das características anatômicas da lâmina foliar.

## Material e Métodos

A confecção das lâminas das secções transversais seguiu os mesmos protocolos utilizados no capítulo 1 – “Morfologia, Anatomia e Histoquímica da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)”.

Para as comparações quantitativas dos mesofilos das 14 espécies deste estudo foram feitas medições de espessura do mesofilo com o auxílio do programa de análise de imagens IMAGE-PRO®PLUS versão 4.1 (Media Cybernetics – Silver Spring, EUA) do Laboratório de Produtos Florestais do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Brasília - DF).

Foram realizadas 25 medidas por espécie, análise de variância (ANOVA) foi aplicada, assim como o teste Tukey para comparação múltipla das médias. Foi utilizado o programa “R: A Language and Environment for Statistical Computing (2006)”. A hipótese nula testada foi: não existe diferença na espessura do mesofilo entre as espécies de diferentes tipos de metabolismo fotossintético. Os valores obtidos foram considerados significativos a nível de 5%.

A determinação dos respectivos tipos de metabolismo fotossintético das espécies *C. burchellii*, *C. criuva*, *C. gardneri* e *C. nemorosa* foi feita através da quantificação da razão de isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das folhas secas e pulverizadas, realizada pelo Prof. Leonel da Silveira Lobo Sternberg (University of Miami).

Para as demais espécies não foi possível realizar a quantificação bioquímica para a determinação dos respectivos tipos de metabolismo porque as amostras foram enviadas fixadas e preservadas em álcool, o que interferiria na análise. A confirmação dos tipos de metabolismo fotossintético foi feita através da literatura e comunicação pessoal com o Prof. Fábio Rúbio Scarano.



## Resultados - Aspectos Anatômicos Influenciados pelo Tipo de Metabolismo Fotossintético

As espécies cuja via fixadora de carbono é apenas o ciclo de Calvin, plantas C<sub>3</sub>, são: *Clusia nemorosa* (Tab. 10) e *C. parviflora*. As espécies que apresentam metabolismo intermediário C<sub>3</sub>/CAM são: *Clusia aemygdioi*, *C. criuva* (Tab. 10), *C. gardneri* (Tab. 10), *C. intermedia*, *C. lanceolata* e *C. marizii*. As espécies com predomínio do metabolismo ácido das crassuláceas são: *Clusia burchellii* (Tab. 10), *C. fluminensis*, *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis*.

**Tab. 10.** Determinação do tipo de metabolismo fotossintético através da quantificação da razão de isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das folhas das espécies oriundas de mata de galeria do Cerrado. Valores expressos em (‰), onde CAM é representado pelo intervalo -16 a -15, C<sub>3</sub>/CAM por -27 a -26 e C<sub>3</sub> por -31 a -28.

Espécies	$\delta^{13}\text{C}$	Metabolismo
<i>Clusia burchellii</i>	-15,50	CAM
<i>Clusia criuva</i>	-27,19	C <sub>3</sub> /CAM
<i>Clusia gardneri</i>	-26,49	C <sub>3</sub> /CAM
<i>Clusia nemorosa</i>	-31,41	C <sub>3</sub>

Como as características anatômicas das espécies já foram descritas no capítulo 1 – “Morfologia, Anatomia e Histoquímica da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)”, aqui somente serão abordadas as diferenças estruturais entre as espécies de diferentes metabolismos.

Os tecidos presentes no mesofilo da lâmina foliar foram as principais estruturas influenciadas pelo metabolismo fotossintético. O mesofilo é muito mais espesso nas espécies CAM (Fig. 36a e Tab. 11), de espessura intermediária nas espécies que realizam ambos os metabolismos (Fig. 36b e Tab. 11) e mais delgado nas espécies C<sub>3</sub> (Fig. 36c e Tab. 11). O mesofilo mais espesso é da espécie CAM *C. spiritu-sanctensis*, com 1223,87±50,45 µm, e o mesofilo mais delgado é da espécie C<sub>3</sub> *C. nemorosa*, com 446,69±18,56 µm. Esta maior espessura do mesofilo nas espécies CAM não é só devido a um possível aumento no número de camadas celulares, mas principalmente ao maior volume celular.

**Tab. 11.** Tipo de metabolismo fotossintético e respectiva espessura do mesofilo ( $\mu\text{m}$ ) das espécies estudadas. Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão, letras iguais representam valores que não diferiram significativamente a 5% de probabilidade.

Espécie	Metabolismo	Mesofilo
<i>Clusia aemygdioi</i>	C3/CAM	574,79 $\pm$ 22,64 <sup>b</sup>
<i>Clusia burchellii</i>	CAM	1170,17 $\pm$ 109,86 <sup>c</sup>
<i>Clusia criuva</i>	C3/CAM	678,69 $\pm$ 43,73 <sup>b</sup>
<i>Clusia fluminensis</i>	CAM	1183,89 $\pm$ 21,52 <sup>c</sup>
<i>Clusia gardneri</i>	C3/CAM	496,78 $\pm$ 38,11 <sup>b</sup>
<i>Clusia hilariana</i>	CAM	1271,82 $\pm$ 22,40 <sup>c</sup>
<i>Clusia intermedia</i>	C3/CAM	568,75 $\pm$ 40,33 <sup>b</sup>
<i>Clusia lanceolata</i>	C3/CAM	615,96 $\pm$ 21,96 <sup>b</sup>
<i>Clusia marizii</i>	C3/CAM	610,67 $\pm$ 41,83 <sup>b</sup>
<i>Clusia nemorosa</i>	C3	446,69 $\pm$ 18,56 <sup>a</sup>
<i>Clusia parviflora</i>	C3	490,90 $\pm$ 13,62 <sup>a</sup>
<i>Clusia spiritu-sanctensis</i>	CAM	1223,87 $\pm$ 50,45 <sup>c</sup>

A hipoderme apresenta-se mais espessa nas espécies C<sub>3</sub> e intermediárias, apesar de *C. nemorosa* (Fig. 36d), uma espécie C<sub>3</sub>, possuir aproximadamente 2 camadas celulares e, *C. gardneri* (Fig. 37a), uma espécie C<sub>3</sub>/CAM, possuir cerca de 3 camadas celulares, estas têm hipoderme com volumes celulares maiores que em *C. burchellii* (Fig. 37b), uma espécie CAM que também apresenta cerca de 3 camadas celulares. Sendo que a espécie que possui maior quantidade de camadas celulares (5-6) neste tecido é *C. parviflora* (Fig. 37c), uma planta C<sub>3</sub>.

O parênquima paliçádico possui menor número de camadas nas espécies C<sub>3</sub> e intermediárias. *Clusia nemorosa* (Fig. 36d), uma planta C<sub>3</sub>, possui uma única camada de células neste tecido, enquanto que as espécies CAM, como *C. fluminensis* (Fig. 37d), apresentam de 4-9 estratos celulares.

O número de camadas do parênquima lacunoso segue a mesma caracterização observada no parênquima paliçádico, apresentando maior número de camadas celulares nas espécies CAM (Fig. 36a). O parênquima lacunoso de *C. parviflora* (Fig. 37c), uma espécie C<sub>3</sub>, é caracterizado por cerca de 16 estratos celulares, uma das maiores quantidades dentre as espécies que realizam o mesmo tipo de metabolismo, no entanto o volume de suas células é menor que nas espécies CAM (Fig. 38). As espécies CAM apresentam parênquima lacunoso de 18-30 camadas celulares, outra característica dessas espécies é referente aos espaços intercelulares, poucos e pequenos (Fig. 38).

## Discussão e Conclusão

Alguns trabalhos confirmam os tipos de metabolismos aqui encontrados. Segundo Franco *et al.* (1994) *C. lanceolata* é espécie C<sub>3</sub>/CAM. De acordo com Herzog *et al.* (1999) *C. criuva* é uma espécie capaz de se adaptar facilmente, apresentando os dois tipos de metabolismo. As espécies que desenvolvem o metabolismo CAM são *C. fluminensis* (Franco *et al.*, 1994) e *C. hilariana* (Gehrig *et al.*, 2003 e Berg *et al.*, 2004).

O aumento dos valores da razão dos isótopos de carbono pode refletir alguma atividade CAM, com a baixa discriminação de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> pela PEP carboxilase quando comparada a Rubisco (Herzog *et al.*, 1999). As razões isotópicas de carbono das folhas variam de -14‰ nas espécies onde o dióxido de carbono é capturado pela enzima PEP carboxilase a -28‰ em espécies onde a maioria do dióxido de carbono é capturada pela Rubisco (Borland *et al.*, 1992 e Roberts *et al.*, 1996). Neste trabalho foram encontrados valores superiores aos encontrados na literatura, como em *C. nemorosa*, onde  $\delta^{13}\text{C} = -31,41\text{‰}$ .

*Clusia* é caracterizado pela presença de espécies C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>/CAM e CAM crescendo simpatricamente em muitas áreas tropicais (Franco *et al.*, 1994), como por exemplo, no Cerrado, onde são encontradas *C. burchellii* (CAM), *C. criuva* (C<sub>3</sub>/CAM) e *C. nemorosa* (C<sub>3</sub>).

As espécies CAM de *Clusia* tendem a ter as folhas mais suculentas, o que pode estar relacionado ao aumento do número de células do mesofilo, sendo este tecido muito mais espesso nas espécies CAM (Ting *et al.*, 1987).

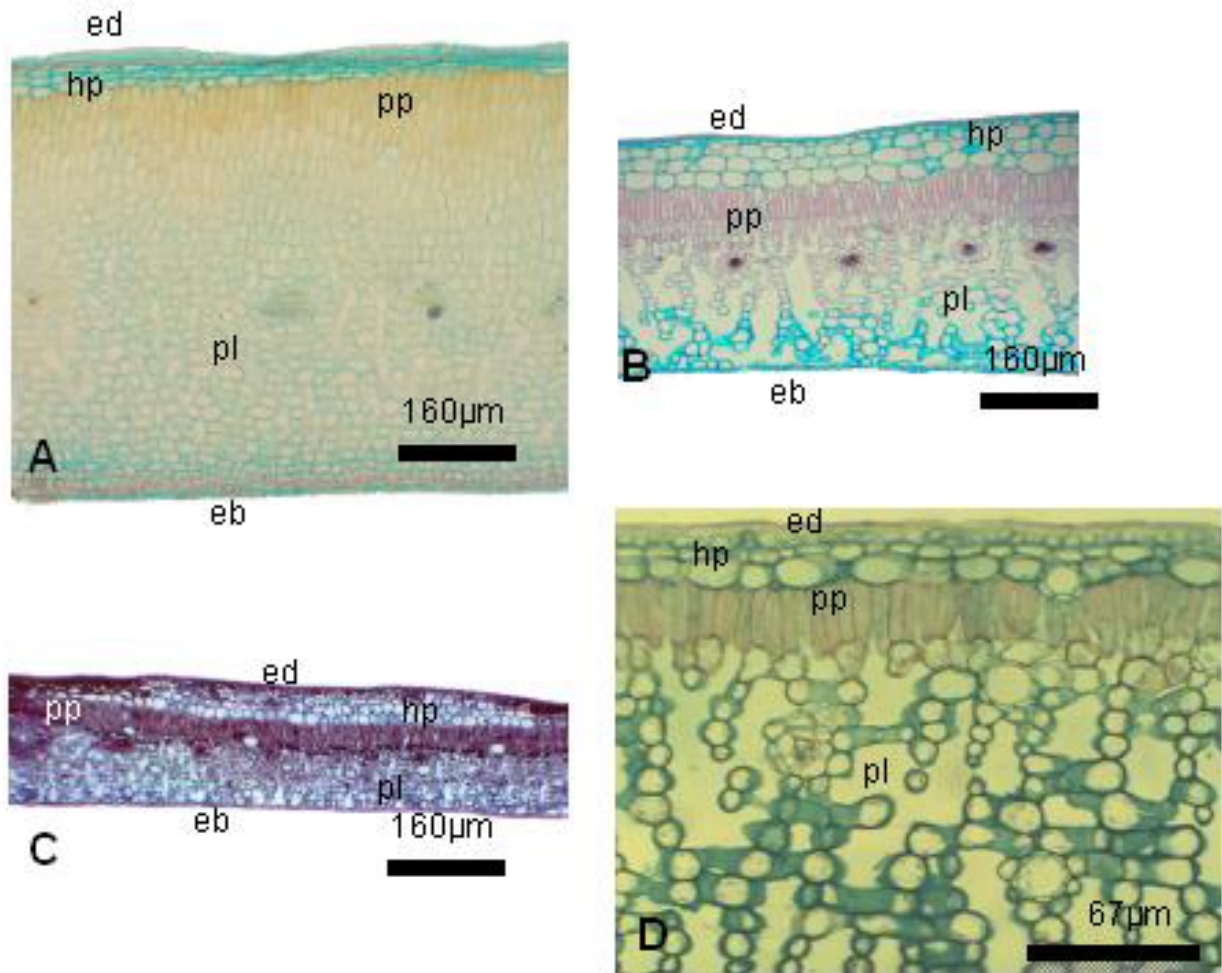
Wylie (1949) afirma que a hipoderme pode estar presente em um grande número de xerófitas, como tecido armazenador de água. No entanto, as espécies CAM – *C. burchellii*, *C. fluminensis*, *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis* - apresentaram menor número de camadas deste tecido, além de células pouco volumosas, desta maneira as células da hipoderme podem não ser suficientes para evitar a perda d'água em condições ambientais extremas, sendo necessária a presença de espessa cutícula.

Os tecidos parenquimáticos apresentam menor número de camadas nas espécies C<sub>3</sub> e intermediárias. As espécies CAM além de possuírem maior número de estratos celulares, apresentam poucos e pequenos espaços intercelulares. Segundo

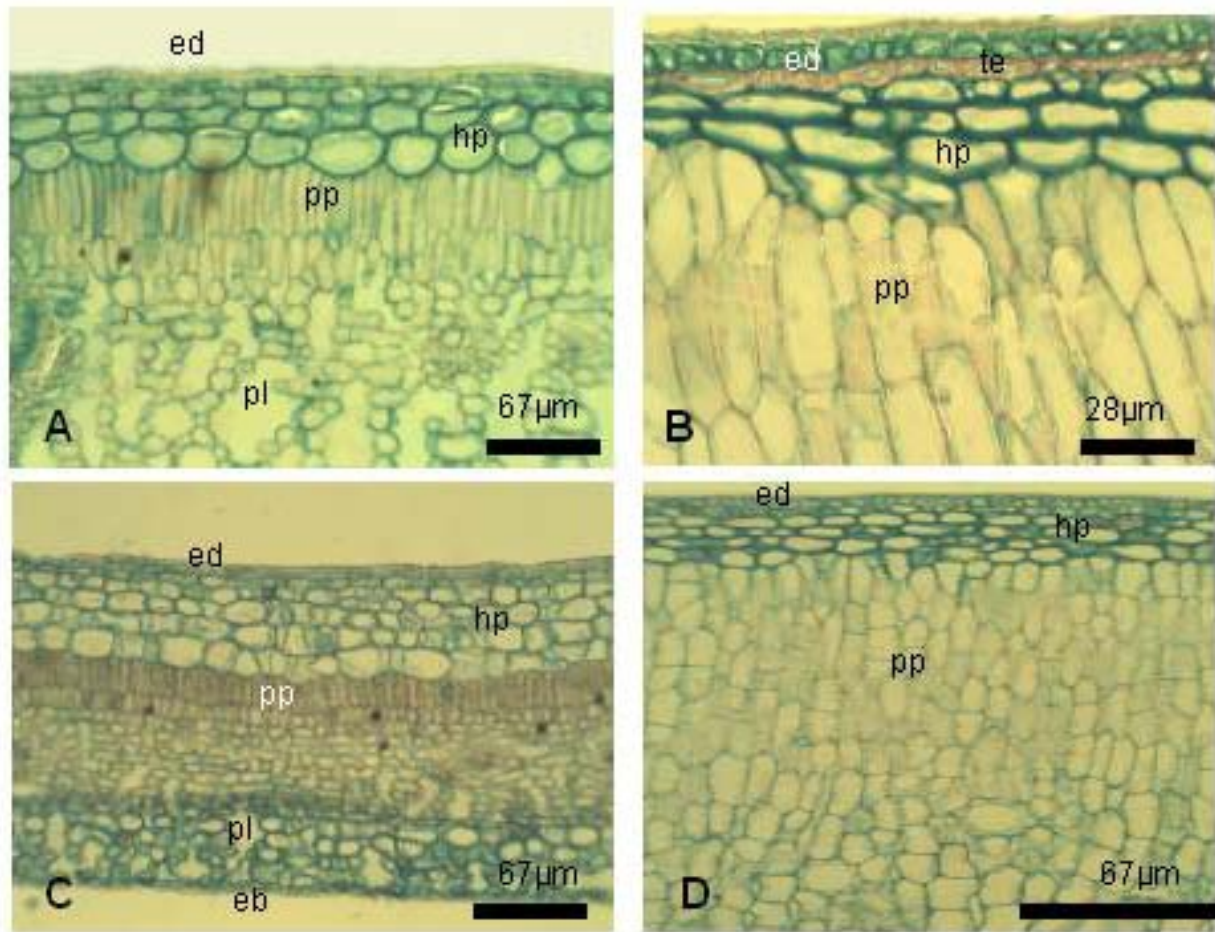
Borland *et al.* (1998), suculência foliar é um pré-requisito para armazenamento vacuolar de ácidos orgânicos, com conseqüente redução do volume dos espaços intercelulares.

As características estruturais distintas entre os tipos de metabolismo fotossintético observados neste trabalho foram: espessura da hipoderme e tecidos parenquimáticos, e quantidade e volume dos espaços intercelulares também foram observadas nos resultados de Borland *et al.* (1998), quando analisaram 3 espécies de *Clusia* – *C. aripoensis* (C<sub>3</sub>), *C. minor* (C<sub>3</sub>/CAM) e *C. rosea* (CAM).

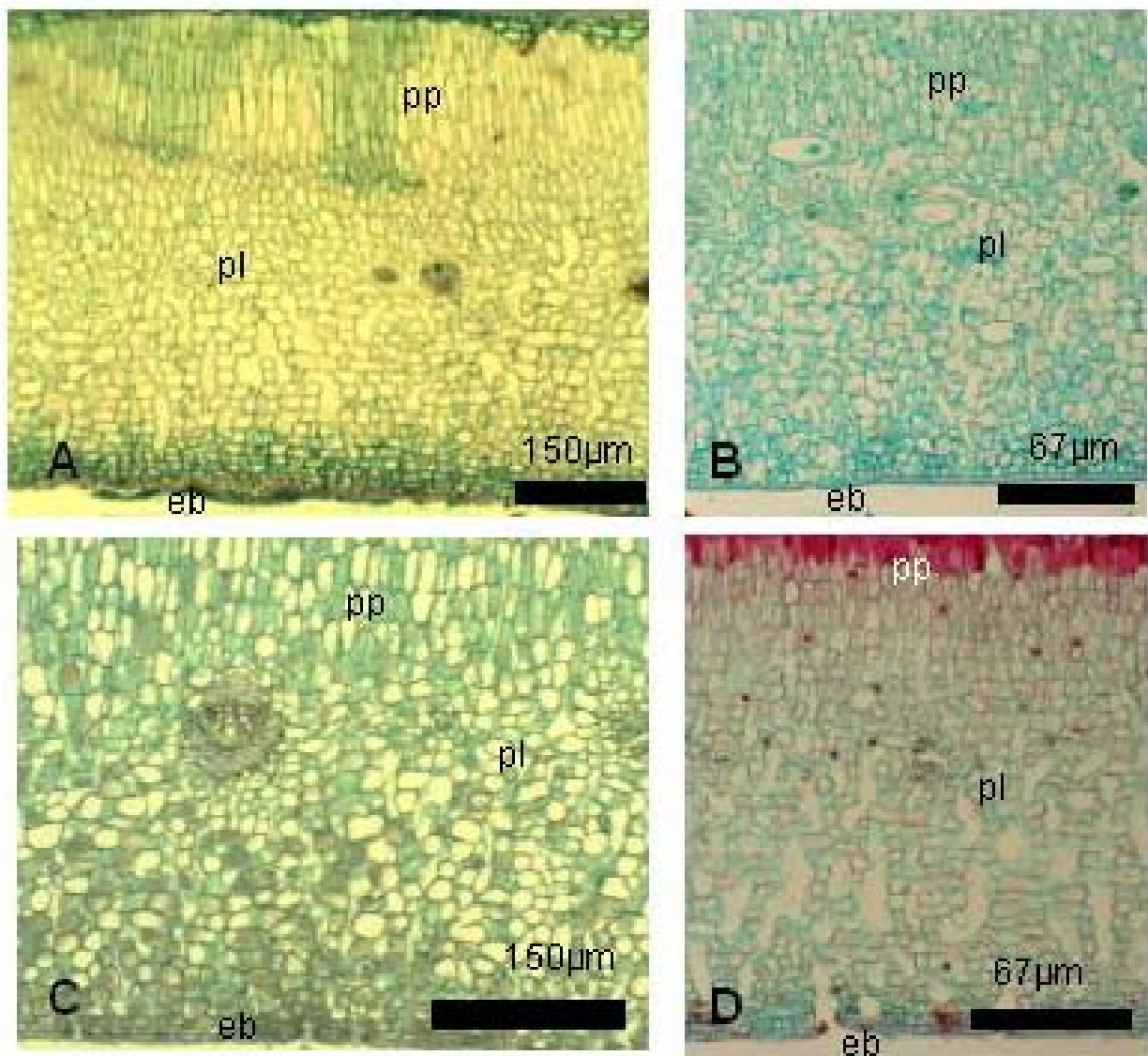
De acordo com Borland *et al.* (1998), diferenças na anatomia foliar entre as espécies de *Clusia* sugerem que a associação entre suculência do mesofilo e capacidade para CAM foi selecionada para ambientes áridos. Entretanto, *Clusia* tem uma ampla distribuição tropical, não estando restrita a ambientes secos ou a hábito de epifitismo (Franco *et al.*, 1994), o que leva a crer que todas as espécies *Clusia* têm um certo potencial genético a CAM. Além do que, segundo Franco *et al.* (1990), para plantas tropicais, como as Clusiaceae, o metabolismo ácido das crassuláceas pode ser um importante mecanismo para a recuperação do dióxido de carbono perdido pela respiração à noite.



**Fig. 36.** Secções transversais da lâmina foliar VIII, evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia burchellii*, espécie CAM, com maior espessura do mesofilo, mas apenas de 2-3 camadas celulares na hipoderme e aproximadamente 30 estratos celulares nos tecidos parenquimáticos. **B:** *Clusia criuva*, espécie  $C_3$ /CAM, com mesofilo de espessura intermediária e de 4 camadas celulares na hipoderme. **C:** *Clusia parviflora*, espécie  $C_3$ , com menor espessura do mesofilo e de 4-5 camadas na hipoderme. **D:** *Clusia nemorosa*, espécie  $C_3$ , com 2 camadas de células na hipoderme, mas com maior volume que nas espécies CAM.



**Fig. 37.** Secções transversais da lâmina foliar IX, evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia gardneri*, espécie  $C_3$ /CAM, com 3 camadas celulares na hipoderme, mas com volumes maiores que nas espécies CAM e apenas 1-2 camadas celulares no parênquima paliçádico. **B:** *Clusia burchellii*, espécie CAM, com hipoderme apresentando volumes celulares reduzidos. **C:** *Clusia parviflora*, espécie  $C_3$ , com menor espessura do mesófilo e de 4-5 camadas na hipoderme, com maior volume celular que as espécies CAM. **D:** *Clusia fluminensis*, espécie CAM, com células da hipoderme de volume reduzido e cerca de 9 camadas de células no parênquima paliçádico.



**Fig. 38.** Secções transversais da lâmina foliar X, evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** *Clusia burchellii*, espécie CAM, com cerca de 30 camadas celulares nos tecidos parenquimáticos, com poucos e pequenos espaços intercelulares. **B:** *Clusia fluminensis*, espécie CAM, com aproximadamente 30 camadas de células no parênquima lacunoso, com poucos e pequenos espaços intercelulares. **C:** *Clusia hilariana*, espécie CAM, com cerca de 18 camadas celulares no parênquima lacunoso, com poucos e pequenos espaços intercelulares. **D:** *Clusia spiritu-sanctensis*, espécie CAM, com cerca de 26 camadas de células no parênquima lacunoso com poucos e pequenos espaços intercelulares.

## **CAPÍTULO 4 - EFEITO DA IRRADIAÇÃO SOLAR NA ESTRUTURA, FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA FOLIAR DE *CLUSIA CRIUVA* CAMBESS.**

**RESUMO:** As respostas apresentadas pelas plantas à variação na disponibilidade de luz costumam envolver alterações nas características das folhas relacionadas à fotossíntese, como área foliar específica, espessura foliar, alterações na proporção de tecidos fotossintetizantes em relação aos não fotossintetizantes, conteúdo de clorofila e carboidratos. O objetivo desse estudo foi avaliar esses parâmetros em folhas de *Clusia criuva* Cambess. de locais sombreados (folhas de sombra) e não sombreados (folhas de sol). As coletas foram realizadas na Reserva Ecológica do Roncador (RECOR-IBGE)-Distrito Federal em região de mata de galeria no Cerrado. Plantas sob maior luminosidade apresentaram menor área foliar específica, aumento na espessura da cutícula na face adaxial, redução da área ocupada pelo parênquima paliçádico e da quantidade de ductos secretores e cristais em forma de drusas. Desta forma, menos material vegetal por unidade de área fica diretamente exposto à luz, reduzindo a perda de água e aumentando o auto-sombreamento entre cloroplastos. O conteúdo de clorofila foi significativamente maior nas folhas de local sombreado. No entanto, não houve diferença na eficiência fotossintética entre folhas de sol e sombra. Os dados encontrados mostram alterações no metabolismo dos carboidratos. Às 9h30min, o conteúdo dos carboidratos não estruturais estava significativamente maior, açúcares solúveis, sacarose, glicose e frutose apresentavam-se em dobro e o amido nove vezes maior nas folhas de sol do que nas de sombra. Folhas de sol apresentaram maior atividade fotossintética e metabólica, quando comparadas com folhas de ambientes sombreados.

**Palavras-chave:** estrutura foliar, fisiologia, folha de sombra, folha de sol, Guttiferae.

**Agradecimentos:** Ao Prof. Augusto C. Franco (Universidade de Brasília) pelas análises de fotossíntese; à Prof<sup>a</sup>. Birgit Orthen (University of Münster, Germany) pelas análises bioquímicas; ao Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA (Brasília - DF) pela utilização do programa Image Pro-Plus; aos biólogos Mariana Saraceno e Davi Rodrigo Rossatto pelo auxílio na manipulação dos aparelhos LI-COR LI-6400, Data Logger LI-COR LI-1000 acoplado ao piranômetro LI – COR LI-200 e, termômetro infravermelho HORIBA IT-330.



## Introdução

A folha é um dos órgãos que melhor reflete as variações estruturais de origem genética e, por se tratar de um dos órgãos mais expostos do vegetal, está sujeita diretamente às variações do ambiente, tornando-se um elemento importante para a análise auto-ecológica de uma espécie ou em estudos de comunidades vegetais (Boeger *et al.* 1997).

Segundo Franco *et al.* (1994) e Roberts *et al.* (1998), membros do gênero *Clusia* pertencem a um pequeno grupo de árvores dicotiledôneas que realizam tanto metabolismo C<sub>3</sub> quanto CAM, algumas espécies são capazes de expressar estas duas vias fotossintéticas, dependendo das condições ambientais (Haag-Kerwer *et al.* 1992). Franco *et al.* (1990) postulou que esta flexibilidade no processo fotossintético possibilitou a dispersão geográfica deste gênero através dos trópicos. De acordo com Vaasen *et al.* (2002), existem evidências moleculares dentro do gênero para uma evolução independente desta flexibilidade no processo de fotossíntese. A espécie em estudo apresenta principalmente o metabolismo C<sub>3</sub> (Herzog *et al.* 1999).

A variação na disponibilidade de luz costuma envolver alterações nas características das folhas de uma mesma espécie. Segundo Givnish (1988), os mecanismos de adaptação a nível da irradiação podem envolver mudanças na forma, fisiologia e organização da folha, assim como na integração funcional das folhas com outras partes da planta. Tais alterações em indivíduos de mesma espécie são consideradas plasticidade fenotípica, definida por Bradshaw (1965) como a alteração na expressão do genótipo pelas influências ambientais, podendo se manifestar tanto morfológica como fisiologicamente.

Estudos anatômicos são importantes, especialmente quando associados aos aspectos ecológicos e comparativos, subsidiando trabalhos taxonômicos (Metcalf & Chalk 1983). Neste trabalho é apresentado um estudo comparativo sobre a folha de espécimes de *Clusia criuva* Cambess. oriundos de ambientes de sol e sombra de uma mata de galeria do Cerrado, com o objetivo de identificar as características foliares que respondem à irradiação solar, em nível anatômico, bioquímico e fisiológico para plantas desta espécie em condições naturais.

## Material e Métodos

As amostras foliares de *C. criuva*, incluindo os pecíolos, foram obtidas de quatro plantas, sendo duas localizadas na borda de uma mata de galeria do Cerrado (ambiente de sol) e duas localizadas no interior da mata (ambiente de sombra). As coletas foram realizadas em julho/2005 (estação de seca) e janeiro/2006 (estação de chuva).

Para a análise dos espécimes de *C. criuva* foram coletadas 25 folhas totalmente expandidas por condição de luz (sol x sombra). As lâminas das secções transversais foram feitas à mão livre e seguiram os mesmos protocolos utilizados no capítulo 1 – “Morfologia, Anatomia e Histoquímica da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)”. A confecção das lâminas dos segmentos paradérmicos, assim como a metodologia para as medidas dos estômatos foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado no capítulo 2 – “Caracterização Epidérmica da Lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)”.

Para as comparações quantitativas dos indivíduos de *C. criuva* de ambientes distintos foram feitas medições de espessura da lâmina foliar, nervura principal, cutícula, epiderme, tecidos parenquimáticos e da hipoderme, do diâmetro do pecíolo e ductos e do comprimento e largura estomáticos com o auxílio do programa de análise de imagens IMAGE-PRO<sup>®</sup>PLUS versão 4.1 (Media Cybernetics – Silver Spring, EUA) do Laboratório de Produtos Florestais do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Brasília - DF).

As taxas de fotossíntese foram obtidas a partir de 2 folhas por indivíduo, 4 por condição de luz, com o sistema portátil LI-COR LI-6400. A concentração de CO<sub>2</sub> do ar foi mantida em 400 ppm e a temperatura foliar em 28°C. Essas medições foram feitas nos dias 29 de junho e 20 de julho de 2005.

Para a caracterização da densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa e seus efeitos na temperatura foliar foram analisadas 10 folhas por condição de luz com os aparelhos Data Logger LI-COR LI-1000 acoplado ao piranômetro LI – COR LI-200 e termômetro infravermelho HORIBA IT-330. As medições foram realizadas no dia 25 de agosto de 2006, em intervalos de 30 minutos entre 9h e 17h, totalizando 16 medidas ao longo do dia.

A concentração de clorofila foi determinada a partir de 2 folhas por indivíduo, 4 por condição de luz. Pequenas porções das folhas foram coletadas (9h30min), armazenadas no gelo durante o transporte e maceradas utilizando acetona 80% como solvente (Linder, 1974). A quantidade de clorofila a e b foi determinada através de espectrofotometria.

A determinação de açúcares e ácidos orgânicos foi feita a partir de 2 folhas por indivíduo, 4 por condição de luz, coletadas (9h30min), armazenadas no gelo, mortas em forno microondas por 10-30 minutos, posteriormente secas até 80°C para cálculo da massa seca, maceradas e extraídas em água (10mg massa seca/mL água destilada) para a determinação em espectrofotometria.

O conteúdo de amido foi determinado por degradação enzimática e os conteúdos de sacarose, frutose e glicose foram analisados a partir da reação acoplada com  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$ , em espectrofotômetro (Bergmeyer & Brent, 1974). Em todas estas análises foi utilizado o espectrofotômetro Gênesis 2 (Pittsford).

Os resultados obtidos entre folhas de sol e sombra foram comparados através do teste t (Student), sendo considerada a folha como unidade amostral. Foi utilizado o programa “R: A Language and Environment for Statistical Computing (2006)”. A hipótese nula testada foi: não existe diferença na estrutura, fotossíntese e composição química foliar de *C. criuva* sob dois diferentes níveis de irradiação solar. Os valores obtidos foram considerados significativos a nível de 5%. Em relação à caracterização da densidade de fluxo de fótons e seus efeitos na temperatura foliar, ambas as variáveis sofreram a análise de variância (ANOVA) hierárquica verificar onde ocorre maior variação – dentro ou entre os espécimes de ambientes distintos, a hipótese nula testada foi: não existe diferença nas taxas de densidade de fluxo de fótons e de temperatura foliar os espécimes estudados, também foram feitas análises de correlação entre essas variáveis.

## **Resultados - Efeito da Irradiação Solar na Estrutura Foliar**

Como as características anatômicas da lâmina foliar de *C. criuva* já foram descritas no capítulo 1 - “Morfologia, Anatomia e Histoquímica da lâmina Foliar de Espécies de *Clusia* (Clusiaceae)”, aqui somente serão abordadas as diferenças

estruturais entre as folhas de sol e de sombra, além das variações relativas a fotossíntese e composição química.

Nos espécimes que se desenvolvem na sombra, a cutícula e as células epidérmicas da superfície adaxial apresentam-se menos espessas (Tab. 12), os tecidos do mesofilo apresentam mais camadas celulares e suas células maiores volumes (Fig. 39a), além de maior quantidade de cristais que os espécimes que se desenvolvem em maior luminosidade.

Nos espécimes de sombra (Fig. 39c) os estômatos são maiores e em menor densidade (Tab. 12) que aqueles encontrados no espécime de sol (Fig. 39d).

Nas amostras dos espécimes de sombra, a nervura principal apresenta mais camadas celulares em todos os tecidos do mesofilo estudados (Tab. 12), além de volumes celulares geralmente maiores, uma vez que a espessura da nervura principal nas folhas de sol é  $511,14 \pm 165,89 \mu\text{m}$  e nas folhas de sombra é de  $663,58 \pm 93,32 \mu\text{m}$ ; conseqüentemente, o diâmetro do cilindro vascular e a concavidade da folha para a face abaxial são maiores (Fig. 40a) em relação aos espécimes de sol (Fig. 40b).

O pecíolo, em secção transversal, apresenta forma variando de cilíndrica a plana. A epiderme mostrou-se uniestratificada composta por células de tamanhos variados, recobertas por cutícula espessa penetrando entre as paredes anticlinais, ausência de estômatos.

A região cortical do pecíolo possui células parenquimáticas de tamanhos e espessamentos de parede desiguais. Presença de cristais em forma de drusas preenchendo quase todo o espaço intracelular. Nota-se ductos secretores normalmente cilíndricos de origem esquizógena (Fig. 40c).

Cilindro vascular formado por feixes colaterais normalmente dispostos em arco aberto em direção ao lado adaxial com extremidades curvadas para a parte interna (Fig. 40e). Da base para o ápice estas extremidades tornam-se completamente fechadas.

A região medular é formada por células parenquimáticas de tamanhos variados, formando espaços intercelulares, células contendo cristais em forma de drusas em menor quantidade que no córtex (Fig. 40e).

As amostras de folhas de sombra apresentaram diâmetro do pecíolo maior ( $4123,83 \pm 773,45 \mu\text{m}$ ) que as folhas de sol ( $2135,46 \pm 751,31 \mu\text{m}$ ), (Tab. 12), além de

maior quantidade de espaços intercelulares no córtex e abundância de cristais em forma de drusas nos folhos de sombra (Fig. 40c).

**Tab. 12.** Análise comparativa das características anatômicas entre folhos de sol e de sombra de *Clusia criuva*. Valores expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão; N = 50 observações para cada variável. Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma linha não diferiram significativamente a 5% de probabilidade.

Estruturas		<i>Clusia criuva</i> sol	<i>Clusia criuva</i> sombra
Pecíolo ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro	2135,46 $\pm$ 751,31 <sup>a</sup>	4123,83 $\pm$ 773,45 <sup>b</sup>
	cutícula	5,35 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup>	5,14 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>
	epiderme	9,96 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup>	8,39 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>
Lâmina Foliar ( $\mu\text{m}$ )	espessura	747,19 $\pm$ 94,34 <sup>a</sup>	824,79 $\pm$ 76,54 <sup>b</sup>
	cutícula adaxial	5,34 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>	4,25 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>
	epiderme adaxial	8,45 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>	6,88 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup>
	hipoderme	186,52 $\pm$ 53,36 <sup>a</sup>	194,84 $\pm$ 46,74 <sup>a</sup>
	p. paliçádico	88,08 $\pm$ 19,76 <sup>a</sup>	117,54 $\pm$ 23,08 <sup>b</sup>
	p. lacunoso	433,18 $\pm$ 59,77 <sup>a</sup>	457,25 $\pm$ 39,09 <sup>a</sup>
	epiderme abaxial	9,81 $\pm$ 2,53 <sup>a</sup>	9,68 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>
	cutícula abaxial	4,37 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	4,24 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
Nervura Principal ( $\mu\text{m}$ )	Espessura	511,14 $\pm$ 165,89 <sup>a</sup>	663,58 $\pm$ 93,32 <sup>b</sup>
Ductos ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro	41,90 $\pm$ 9,41 <sup>a</sup>	41,62 $\pm$ 10,62 <sup>a</sup>
Estômatos	densidade(mm <sup>2</sup> )	220,34 $\pm$ 41,81 <sup>a</sup>	162,86 $\pm$ 13,78 <sup>b</sup>
	Comprimento( $\mu\text{m}$ )	26,26 $\pm$ 4,85 <sup>a</sup>	34,39 $\pm$ 3,09 <sup>b</sup>
	largura( $\mu\text{m}$ )	9,17 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	7,97 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>

## Resultados - Efeito da Irradiação Solar na Fotossíntese e Composição Química Foliar

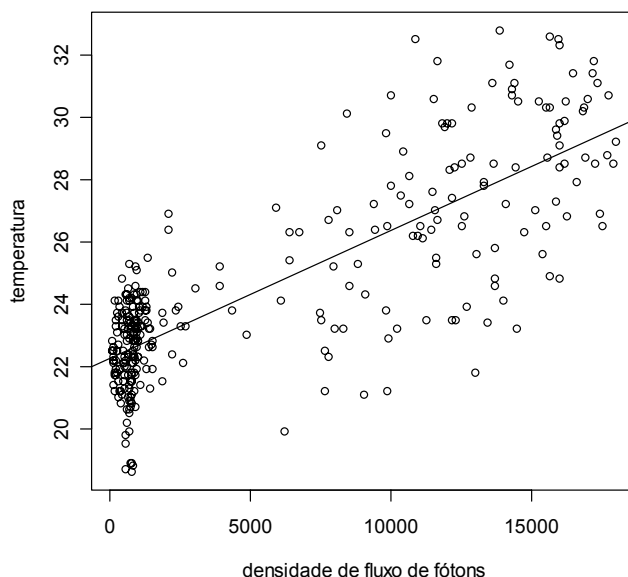
Plantas de sol e sombra diferem em estrutura e composição química. A área específica foliar foi aproximadamente 25% menor nas amostras de folhos de sol (6,02 $\pm$ 0,81 m<sup>2</sup>kg<sup>-1</sup>) que nas de sombra (8,08 $\pm$ 2,45 m<sup>2</sup>kg<sup>-1</sup>). O conteúdo de clorofila por unidade de área foliar, bem como por massa seca, foi significativamente maior nas folhos de local sombreado. Os dados encontrados mostram diferenças na magnitude do metabolismo dos carboidratos e ácidos orgânicos, às 9h30min, o conteúdo dos carboidratos não estruturais foi significativamente maior, sacarose e frutose apresentavam-se em dobro e o amido nove vezes maior nas folhos de sol do que nas de sombra (Tab. 13).

**Tab. 13.** Análise comparativa das características e composição química das folhas de sol e de sombra de *Clusia criuva*. Conteúdo de água por porcentagem de massa seca (%MS), área foliar específica (SLA) e conteúdo de carboidratos, ácidos orgânicos e clorofila. Dados expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão; N = 4 folhas para cada condição de luz. Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma linha não diferiram significativamente a 5% de probabilidade.

Medidas		<i>Clusia criuva</i> sol	<i>Clusia criuva</i> sombra
Água	conteúdo (%MS)	455,63 $\pm$ 33,85 <sup>a</sup>	425,99 $\pm$ 47,92 <sup>a</sup>
	SLA (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )	6,02 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	8,08 $\pm$ 2,45 <sup>b</sup>
Carboidratos	sacarose(mmol m <sup>-2</sup> )	4,36 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	1,70 $\pm$ 1,93 <sup>b</sup>
	glicose(mmol m <sup>-2</sup> )	4,81 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	12,43 $\pm$ 4,67 <sup>b</sup>
	frutose(mmol m <sup>-2</sup> )	45,51 $\pm$ 3,10 <sup>a</sup>	21,66 $\pm$ 8,23 <sup>b</sup>
	amido(mmol m <sup>-2</sup> )	18,18 $\pm$ 6,73 <sup>a</sup>	1,88 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>
Ácidos Orgânicos	malato(mmol m <sup>-2</sup> )	6,14 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	3,41 $\pm$ 1,39 <sup>b</sup>
	citrato(mmol m <sup>-2</sup> )	67,61 $\pm$ 6,35 <sup>a</sup>	52,68 $\pm$ 13,15 <sup>b</sup>
Clorofila	A (µg cm <sup>-2</sup> )	46,21 $\pm$ 8,31 <sup>a</sup>	62,68 $\pm$ 9,14 <sup>b</sup>
	B (µg cm <sup>-2</sup> )	25,87 $\pm$ 5,01 <sup>a</sup>	32,39 $\pm$ 3,94 <sup>b</sup>

Tanto a densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa quanto a temperatura foliar apresentaram valores significativamente diferentes entre os indivíduos de diferentes ambientes. A densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa medida nas folhas de sol teve média 10484,25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , enquanto a média para as folhas de sombra foi 775,06  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Existe correlação significativa e diretamente proporcional entre luminosidade e temperatura (Graf. 4).

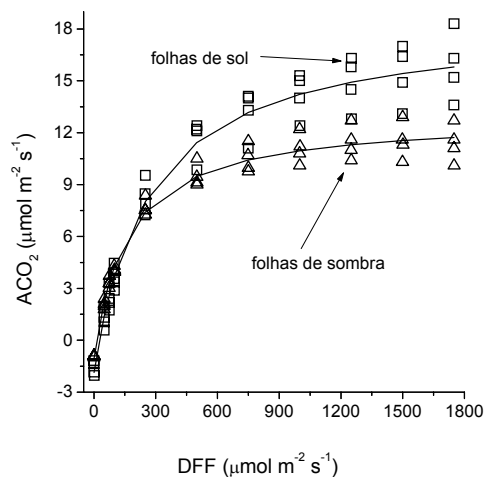
**Graf. 4.** Relação entre densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa (DFF  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) e temperatura foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ) nos indivíduos de sol e de sombra, sendo  $r^2$  de 0,72 para as folhas de sol e 0,68 para as folhas de sombra. N = 10 folhas para cada condição de irradiação de luz.



Os indivíduos de sol apresentaram maior taxa fotossintética de acordo com a variação da intensidade luminosa, sendo que algumas folhas mantiveram a respectiva taxa crescente mesmo a uma densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa de  $1750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Graf. 5).

Nos indivíduos de sombra, a taxa fotossintética máxima mostrou-se menor que naqueles de sol e a saturação foi alcançada, por volta da intensidade luminosa  $1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Graf. 5).

**Graf. 5.** Relação entre a taxa de fotossíntese ( $A \text{ CO}_2/\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e a densidade de fluxo de fótons na faixa fotossinteticamente ativa nos indivíduos de sol e de sombra ( $\text{DFF } \mu\text{mol/m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Foi ajustada uma hipérbole retangular, sendo  $r^2$  de 0,97 para as folhas de sol e 0,98 para as folhas de sombra.  $N = 4$  folhas para cada condição de irradiação de luz.



Os valores médios referentes a assimilação máxima de dióxido de carbono, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso de água foram obtidos a uma densidade de fluxo de fótons de  $1500$  e  $1750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Folhas de sol apresentaram maiores valores de assimilação máxima de  $\text{CO}_2$ , condutância estomática. Não foram encontradas diferenças na eficiência intrínseca de uso de água entre folhas de sol e sombra (Tab. 14).

A eficiência fotossintética e o ponto de compensação de luz foram obtidos a partir de regressão linear para os pontos iniciais da curva de resposta à luz ( $\text{DFF}$  de  $0$  a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para cada folha individual. Não foram encontradas diferenças na

eficiência fotossintética folhas de sol e sombra, mas os valores de ponto de compensação de luz foram mais altos para as folhas de sol. Os valores de respiração foram obtidos na ausência de luz, sendo que folhas de sol apresentaram maiores valores de respiração (Tab. 14).

**Tab. 14.** Análise comparativa das características fisiológicas entre folhas de sol e de sombra de *Clusia criuva*. Valores máximos de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A^{\max}$ ;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $G^{\max}$ ;  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e eficiência intrínseca de uso de água ( $A^{\max}/G^{\max}$ ;  $\mu\text{mol l mol}$ ), eficiência fotossintética (EF;  $\text{mol CO}_2/\text{mol fótons}$ ), ponto de compensação de luz (PTL;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e respiração no escuro ( $R^{\text{esc}}$ ;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dados expressos em termos de média  $\pm$  erro padrão; N = 4 folhas para cada condição de irradiação solar. Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma linha não diferiram significativamente a 5% de probabilidade.

Valores	<i>Clusia criuva</i> sol	<i>Clusia criuva</i> sombra
$A^{\max}$	15,6 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>
$G^{\max}$	0,330 $\pm$ 0,0167 <sup>a</sup>	0,219 $\pm$ 0,0274 <sup>b</sup>
$A^{\max}/G^{\max}$	47,3 $\pm$ 1,219 <sup>a</sup>	54,1 $\pm$ 5,161 <sup>a</sup>
EF	0,052 $\pm$ 0,0024 <sup>a</sup>	0,051 $\pm$ 0,0006 <sup>a</sup>
PTL	30 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>
$R^{\text{esc}}$	1,6 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>

## Discussão e Conclusão

Esau (1974) ressalta que as características de adaptação ao ambiente podem ser de ordem morfológica, anatômica e fisiológica, podendo variar ou serem fixados geneticamente, a despeito das variações do meio.

A lâmina foliar é a parte da planta que mais se modifica nas interações com o ambiente, sendo importante nos estudos de anatomia ecológica das espécies (Paviani, 1978). A mesma autora, em trabalho posterior (1984) defende a necessidade de abordar, nos estudos de anatomia ecológica, aspectos não exclusivamente anatômicos, pois há uma estreita interdependência entre a morfologia interna e externa, a fisiologia e do indivíduo com o ambiente.

Diversos estudos relatam a ocorrência de alterações na organização do mesófilo em função da luminosidade (Chabot *et al.*, 1979; Voltan *et al.*, 1992; Cao, 2000; Hanba *et al.*, 2002 e Justo *et al.*, 2005). Os resultados obtidos indicam que *C. criuva* apresentou plasticidade anatômica expressa por várias características foliares –



diâmetro do pecíolo, espessura da nervura principal, altura da cutícula e células epidérmicas, espessura do mesofilo, proporção de tecidos fotossintetizantes, densidade e dimensões estomáticas.

A região onde os indivíduos de *C. criuva* foram coletados é caracterizada por duas estações climáticas bem definidas – seca e chuva. Os resultados obtidos para o mesmo espécime, tanto na primeira coleta (seca) quanto na segunda (chuva), foram similares, confirmando os dados de Geeske *et al.* (1994), de que não há evidência que o nível de precipitação afete consideravelmente a anatomia foliar. Por outro lado, confirmando informações anteriores de Morretes & Ferri (1972), Sobrado & Medina (1980) e Boeger *et al.* (1997), que estudaram este gênero, caracteres habitualmente tidos como de adaptação a ambientes xéricos estão presentes nos espécimes com razoável frequência: cutícula espessa, número elevado de estômatos e presença de tecido mecânico.

Para Esau (1974) e Espírito Santo & Pugialli (1999), o crescimento e a organização da lâmina foliar são influenciados por fatores ambientais como a temperatura, a intensidade de luz e a disponibilidade de água. Goulet & Bellefleur (1986) afirmam que os efeitos da luz (sol e sombra) também influenciam na plasticidade foliar, alterando a espessura, a área e outras características desse órgão vegetal. As diferenças encontradas entre espécimes de sol e de sombra para a maioria das características morfo-anatômicas examinadas confirmam a plasticidade da lâmina foliar desta espécie em resposta a luz.

Segundo Voltan *et al.* (1992) e Dickison & Weitzman (1996), variações na espessura da lâmina e cutícula, grau de desenvolvimento do parênquima paliçádico, volume dos espaços intercelulares, frequência dos estômatos e densidade dos feixes vasculares podem estar relacionados com a eficácia da fotossíntese, quantidade de luz que alcança a planta e disponibilidade de água. Na espécie estudada, as estruturas citadas pelos autores apresentam-se de forma diferenciada dependendo do ambiente de origem da planta – parênquima paliçádico, volume dos espaços intercelulares e densidade dos feixes vasculares são características mais evidenciadas no espécime de sombra.

Os fatores ambientais influenciam de maneira notável a espessura e a composição da cutícula (Eames & MacDaniels, 1947; Skoss, 1955 e Bleckmann *et al.*,

1980). Segundo Pyykkö (1966), as folhas de sol são dotadas de cutícula mais espessa e com maior proporção de cera do que as que se desenvolvem em ambiente úmido. Esau (1974), por sua vez, frisa que a cutícula, assim como as camadas cutinizadas e a cera superficial, desempenham relevante papel na redução da perda de água. Confirmando esses trabalhos, nos espécimes estudados a cutícula na superfície adaxial mostrou-se mais espessa nos indivíduos mais expostos ao sol.

A densidade dos estômatos foi superior nos indivíduos que se desenvolvem no sol ( $220,34 \pm 41,81$  estômatos/mm<sup>2</sup>) em relação aos que se desenvolvem na sombra ( $162,86 \pm 13,78$  estômatos/mm<sup>2</sup>), assim como o comprimento estomático nas folhas de sol ( $26,26 \pm 4,85$  µm) e de sombra ( $34,39 \pm 3,09$  µm). Carey (1938) refere que o tamanho das células epidérmicas reflete uma interação entre os fatores ambientais e hereditários, conseqüentemente o aparelho estomático também sofre tais influências que se fazem sentir sobre cada indivíduo, sendo algumas espécies mais plásticas do que outras. Segundo Gindel (1968) e Figuerôa *et al.* (2004), condições como deficiência hídrica no solo e clima árido podem resultar em modificações morfológicas, como aumento da densidade estomática, geralmente acompanhada pela diminuição do comprimento dos estômatos. Entretanto, Wilkinson (1983) afirmou que condições secas e/ou de pleno sol tendem a produzir estômatos grandes.

Paula (1974b), utilizou critérios de freqüência estomática para identificar gêneros e espécies de Clusiaceae. Entretanto, no presente estudo, as densidade e largura estomáticas são maiores nos espécimes de sol, apoiando Esau (1974) e Fahn (1982) que afirmam que o número de estômatos por unidade de área é muito variável e pode ser influenciado por fatores ambientais, sendo uma característica de pouco valor taxonômico. Densidade e largura estomáticas maiores nos espécimes de sol reflete em maiores valores de condutância estomática e taxa fotossintética para estes indivíduos, mas não ocorreram diferenças na eficiência de uso de água entre indivíduos de sol e sombra.

Na análise anatômica dos espécimes de sol, ocorre aumento na espessura da cutícula adaxial, redução da área ocupada pelo parênquima paliçádico, da quantidade de ductos secretores e de cristais em forma de drusas. Desta forma, menos material vegetal por unidade de área fica diretamente exposto à luz, reduzindo a perda de água e aumentando o auto-sombreamento entre cloroplastos. Por manter contato direto com

o ambiente, a epiderme está sujeita a modificações estruturais em decorrência de vários fatores ambientais (Cutter 1986a). As células epidérmicas adaxiais dos indivíduos que se desenvolvem no sol são revestidas por cutícula mais espessa que aquelas dos indivíduos que se desenvolvem na sombra. De acordo com Cutter (1986b), esse espessamento representa uma importante função mecânica na proteção do órgão no caso de escassez de água, de acordo com as condições ambientais de luz e umidade.

As células da hipoderme não apresentaram diferenças significativas em relação à espessura; segundo Borland *et al.* (1998), a hipoderme de *Clusia* funciona como um tecido de armazenamento de água, apesar das células largas não serem capazes de evitar uma perda de água para o ambiente, desta maneira a presença de cutícula espessa se faz necessária (Kaul, 1977), corroborando com os dados encontrados.

Os espaços intercelulares do parênquima lacunoso são menores e há menor quantidade de drusas e ductos secretores no tecido parenquimático do espécime de sol. Segundo Espírito Santo & Pugialli (1999), dois fatores que contribuem para um aumento na dimensão das folhas de sombra são a maior disponibilidade de água e a redução da luz, o que está de acordo com este trabalho.

Nos indivíduos estudados existem cristais em maior quantidade nos espécimes de sombra. De acordo com Fahn (1982) muitas plantas possuem em suas células depósitos de excreção constituídos de matéria inorgânica, na maioria das vezes sais de cálcio, formando os cristais. Conforme Prychid & Ruddal (1999), os cristais, além da importância taxonômica, podem representar formas de armazenamento de cálcio e ácido oxálico, e também serem depósitos de substâncias de metabolismo secundário.

Os ductos secretores estão em maior proporção no pecíolo em relação à lâmina foliar. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os diâmetros dos ductos dos indivíduos de sol e de sombra.

O pecíolo apresenta o mesmo padrão dos resultados verificados na lâmina foliar, salientando que as células do córtex possuem volumes maiores naqueles indivíduos de ambiente de sombra.

As plantas sob maior luminosidade apresentaram menor área foliar específica; segundo Niinemets (1995), um maior investimento de carbono pela folha pode ser utilizado para manutenção mecânica. No entanto, esta diferença não se deve a um

aumento da espessura da folha em resposta a altos níveis de irradiação solar, pois nos espécimes estudados, as folhas de sombra apresentaram maior espessura. Estas diferenças se devem provavelmente a um aumento da densidade nas folhas em ambientes iluminados, que apresentaram menor quantidade de espaços intercelulares e uma maior quantidade de carbono por unidade de área foliar.

O fato do conteúdo de clorofila por unidade de área foliar, bem como por massa seca, ter sido significativamente maior nas folhas de local sombreado, reflete maior investimento na captura de luminosidade sob baixa irradiação. No entanto, não houve diferença na eficiência fotossintética entre folhas de sol e sombra. Por outro lado, folhas de sol apresentaram maior atividade metabólica, tendo em vista a maior fixação de carboidratos e valores mais altos de respiração. Herzog *et al.* (1999) também não encontraram diferenças na eficiência fotossintética entre plantas de sol e sombra, utilizando medidas de fluorescência da clorofila em resposta a variações na intensidade luminosa.

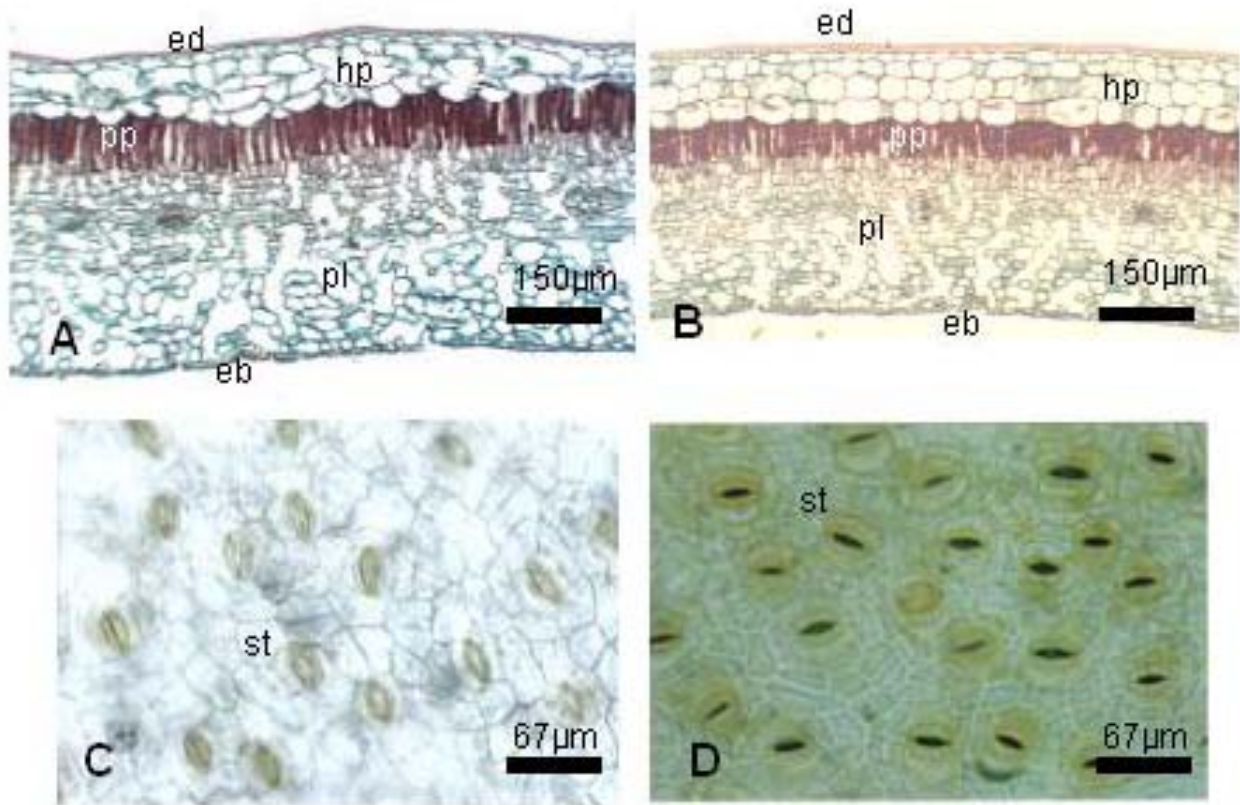
De maneira geral o metabolismo fotossintético e de ácidos orgânicos de *C. criuva* responde a diferentes regimes luminosos. A análise dos ácidos orgânicos pode ser utilizada para testar a atividade CAM (Herzog *et al.*, 1999). Assim como encontrado por Roberts *et al.* (1998), quando analisaram folhas de *C. minor* de ambientes distintos, os indivíduos de ambiente mais exposto apresentaram maior concentração de ácidos orgânicos. Este resultado pode sugerir uma maior expressão do metabolismo ácido das crassuláceas em indivíduos mais expostos à irradiação solar. Segundo Herzog *et al.* (1999), esta adaptação promove forte proteção contra a fotoinibição durante períodos de alta irradiação pelo estabelecimento de uma alta concentração interna de CO<sub>2</sub>.

De acordo com Evans (1999), o parênquima paliçádico mais próximo à superfície facilita a penetração da luz para o interior da folha, enquanto o parênquima lacunoso promove a dispersão de moléculas de clorofila para melhorar a absorção de luz; o que é confirmado no espécime que se desenvolve ao sol, o qual apresenta diminuição da área ocupada pelo parênquima paliçádico e menor conteúdo de clorofila por unidade de área, visto que está submetido a uma intensidade luminosa maior.

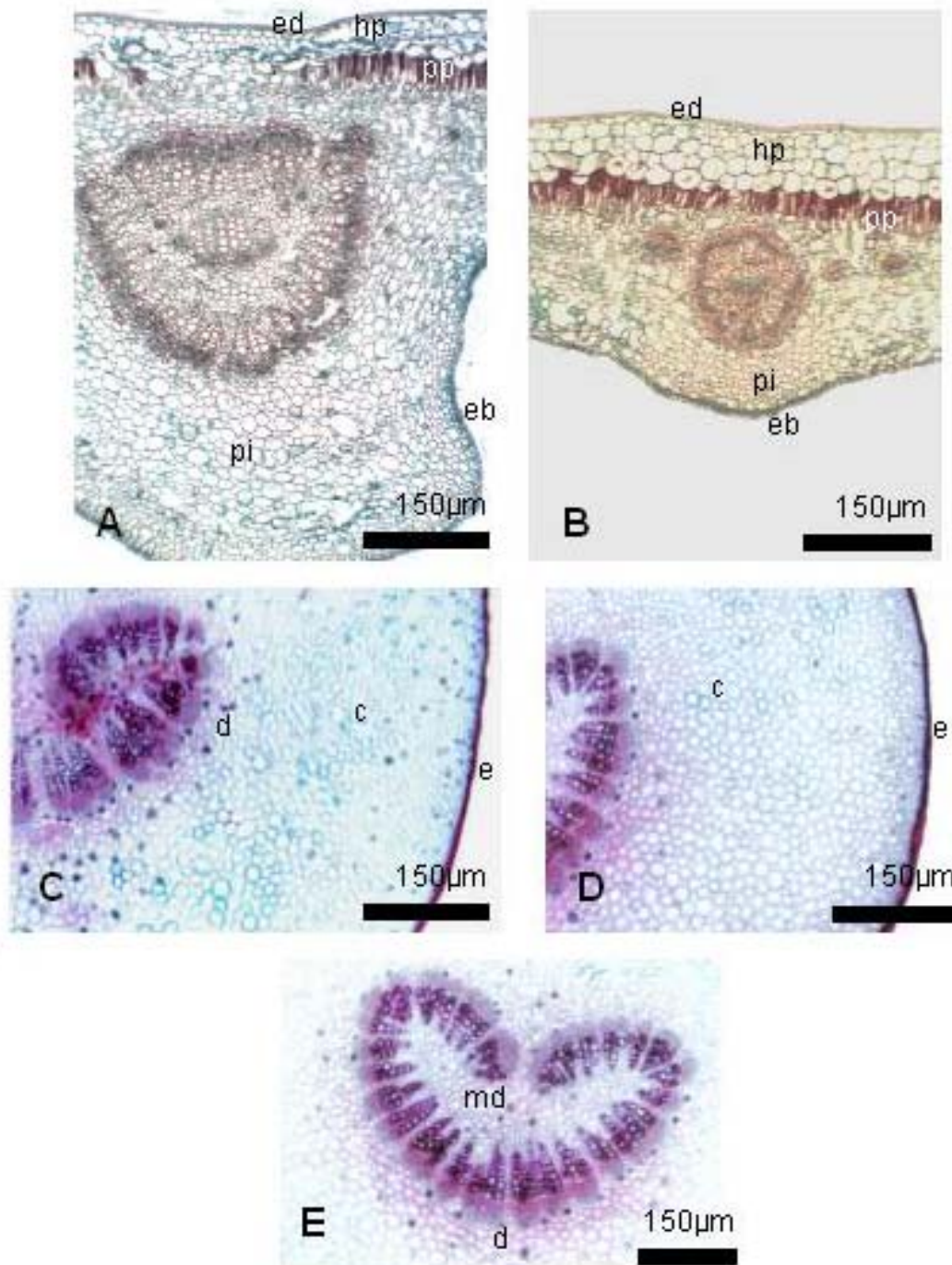
Não foram encontradas diferenças na eficiência fotossintética e na eficiência intrínseca de uso de água entre folhas de sol e sombra, confirmando dados de Yamashita *et al.* (2002) que afirmam que pequenas variações na espessura da folha

resultam em significativas variações na fotossíntese em algumas espécies, enquanto outras apresentam grande plasticidade na espessura foliar com pouca variação na capacidade fotossintética.

Diante dos resultados aqui presentes, conclui-se que as características anatômicas e o metabolismo do carbono em *C. criuva* apresentam plasticidade fenotípica em resposta às condições luminosas. As características mais marcantes nos indivíduos que se desenvolvem na sombra são: estômatos maiores e em menor densidade demográfica, maior espessura foliar devido ao maior número de camadas dos tecidos do mesofilo, maior concentração de ductos e cristais e maior diâmetro do pecíolo. Folhas de sol apresentaram maior atividade fotossintética e metabólica, quando comparadas com folhas de ambientes sombreados.



**Fig. 39.** Secções transversais de *Clusia criuva* da lâmina foliar (A-B) e paradérmicas da superfície abaxial (C-D) evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb), esta com estômatos (st), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl). **A:** folha de sombra, apresentando hipoderme e parênquima lacunoso com maiores volumes e camadas celulares. **B:** folha de sol, apresentando redução na espessura do mesófilo. **C:** folha de sombra, com estômatos maiores em menor frequência. **D:** folha de sol, com estômatos menores e em maior frequência.



**Fig. 40.** Secções transversais da folha de *Clusia criuva*, nervura principal (A-B) e pecíolo (C-E) evidenciando epiderme em face adaxial (ed) e abaxial (eb), hipoderme (hp), parênquima paliçádico (pp) e parênquima com células isodiamétricas (pi), e no pecíolo epiderme (e), córtex (c), medula (md) e drusas (d). **A:** folha de sombra, apresentando nervura principal com maior espessura e camadas celulares. **B:** folha de sol, apresentando nervura principal com menor espessura. **C:** folha de sombra, com maior quantidade de células e drusas no córtex. **D:** folha de sol. **E:** Detalhe do pecíolo de *Clusia criuva*, folha de sol, apresentando cilindro vascular em arco.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise estrutural das folhas das 14 espécies do gênero *Clusia* foram observados padrões de venação distintos, o que pode auxiliar no reconhecimento das mesmas em estágio vegetativo, sendo os caracteres mais confiáveis o ângulo e a forma do ápice, ângulo das nervuras secundárias (principalmente quando comparado o ápice com o restante da lâmina foliar), posição da veia última marginal e presença de invaginação desta na região da nervura principal.

As espécies possuem acentuada uniformidade em nível anatômico, no que se refere aos aspectos gerais da lâmina foliar, como tipo e disposição dos tecidos presentes. Uma das distinções entre as mesmas é a quantidade de camadas celulares em cada tecido. No entanto, amostras de uma mesma espécie, quando submetida a diferentes ambientes também pode apresentar estas variações, uma plasticidade fenotípica, como foi observado em espécimes de *C. criuva* sob diferentes intensidades luminosas; desta maneira não é confiável aplicar valor taxonômico apenas às quantidades diferentes de camadas celulares. Entretanto, quando associado a outros parâmetros, e em intervalos de espessura distintos, é possível utilizar o número de camadas celulares para a distinção das espécies.

Foram descritas nas lâminas foliares características escleromorfas – como cutícula e camadas cuticulares espessas, células volumosas na hipoderme, esclerênquima abundante e parênquima paliçádico em várias camadas. Essas características podem conduzir à hipótese da ocorrência de adaptação evolutiva a ambientes como o Cerrado. Entretanto, várias outras espécies, que também possuem tais características, são oriundas de ambientes desprovidos de clima árido ou semi-árido, por exemplo, Restinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Além do mais, os estudos realizados sobre as espécies do gênero *Clusia* não abordam os caracteres edáficos dos respectivos ambientes. Desta maneira pode-se acreditar na origem filogenética dessas características escleromorfas.

Os estudos histoquímicos demonstraram a presença de compostos lipofílicos, carboidratos estruturais e não-estruturais nas folhas. Entre os metabólitos secundários constatou-se a presença de lignina e outros compostos fenólicos, principalmente taninos, importantes para a defesa dessas espécies contra predação e, diminuição do



índice de parasitismo. Não foram encontrados alcalóides, resinas e sílica. De acordo com os testes realizados, o produto de secreção dos ductos é constituído de compostos lipofílicos.

A análise das amostras paradérmicas da superfície abaxial, acrescentou várias informação sobre estrutura, tamanho e densidade dos estômatos, confirmando, com valores significativos estatisticamente, trabalhos anteriores como Muenscher (1915) que mencionou a relação inversamente proporcional entre comprimento e densidade estomáticos, e Eckerson (1908), que afirmou que a passagem de gases pelo estômato é dependente do comprimento, e não da área dessas estruturas.

Os resultados dos estudos paradérmicos foram obtidos a partir da análise de todas as espécies, desta maneira, as relações entre as dimensões lineares do estômato com as respectivas densidades, independem da espécie ou da condição ambiental na qual se encontra.

O estudo das superfícies sob microscopia eletrônica de varredura forneceu informações detalhadas relacionadas à micromorfologia com possível aplicação taxonômica. Dentre as principais características distintas entre as espécies estão: tipo de deposição das ceras epicuticulares; tipo de espessamento e ornamentação das fibrilas celulósicas na parede celular das células subsidiárias; e espessamento nas paredes ventrais das células-guarda. Confirmando o valor taxonômico das superfícies foliares citado em trabalhos anteriores (Van Cotthem, 1970; Denton, 1994; Barthlott *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2004; e Yang & Lin, 2005).

Nogueira *et al.* (2001) afirmaram que, devido à similaridade morfológica e bioquímica entre *C. parviflora* e *C. criuva*, seria melhor considerar a primeira como uma subespécie da segunda. Em relação às secções transversais ambas são bastante similares, diferindo basicamente no número de camadas celulares do mesofilo. Entretanto, os estômatos de *C. criuva* são elípticos e os de *C. parviflora* são circulares; *C. parviflora* apresenta espessamento nas paredes ventrais das células-guarda, característica ausente em *C. criuva*; *C. criuva* possui muita ornamentação nas paredes das células subsidiárias e *C. parviflora* tem pouca ornamentação nessas paredes; *C. parviflora* realiza somente o ciclo de Calvin como via fixadora de carbono, enquanto *C. criuva* também é adaptada ao metabolismo ácido das crassuláceas. Devido a todas as diferenças mencionadas, é mais adequado considerá-las duas espécies distintas.

Foram analisadas 2 espécies que utilizam apenas o metabolismo  $C_3$  (*C. nemorosa* e *C. parviflora*), 6 espécies adaptadas a ambos os metabolismos  $C_3$ /CAM (*C. aemygdioi*, *C. criuva*, *C. gardneri*, *C. intermedia*, *C. lanceolata* e *C. marizii*) e 4 espécies CAM (*C. burchellii*, *C. fluminensis*, *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis*). Não houve relação entre o ambiente de origem e o tipo de metabolismo fotossintético, uma vez que espécies oriundas do mesmo ambiente, como as espécies de mata de galeria do Cerrado - *C. burchellii*, *C. criuva* e *C. nemorosa* - apresentaram tipos de metabolismo fotossintético distintos, sugerindo maior influência filogenética que ambiental para esta característica.

As espécies CAM apresentaram folhas mais suculentas devido ao aumento do número de camadas celulares do mesofilo. Outra característica em comum nessas espécies é a presença de poucos e pequenos espaços intercelulares.

Além do tipo de metabolismo fotossintético, a variação na disponibilidade de luz também envolveu alterações nas características das folhas, sendo observada plasticidade fenotípica em *C. criuva*.

Na análise anatômica das lâminas foliares dos espécimes de sol, ocorrem estômatos menores e em maior proporção, aumento na espessura da cutícula adaxial, redução da área ocupada pelo parênquima paliçádico, dos espaços intercelulares do parênquima lacunoso, da quantidade de ductos secretores e de cristais em forma de drusas. No pecíolo, as células do córtex possuem volumes maiores nos indivíduos de ambiente de sombra.

As plantas sob maior luminosidade apresentaram menor área foliar específica, esta diferença se deve provavelmente a um aumento da densidade nas folhas em ambientes iluminados, que apresentaram menor quantidade de espaços intercelulares e uma maior quantidade de carbono por unidade de área foliar.

O conteúdo de clorofila por unidade de área foliar, bem como por massa seca, foi significativamente maior nas folhas de sombra, reflete maior investimento na captura de luminosidade sob baixa irradiação. Entretanto, não houve diferença na eficiência fotossintética entre folhas de sol e sombra, apesar das folhas de sol apresentaram maior atividade metabólica, devido a maior fixação de carboidratos e ácidos orgânicos, e valores mais altos de respiração.

A presente dissertação é apenas o início de um processo de análises sobre um gênero encontrado em uma ampla variedade de ambientes, e que apresenta importância econômica (plantas medicinais e ornamentais) e ecológica (plantas pioneiras ou facilitadoras da entrada de outras espécies na comunidade), cujas algumas espécies estão ameaçadas de extinção. Outro fator que eleva o interesse neste gênero é o fato de apresentar espécies CAM, sendo, até o momento, o único registro de uma árvore dicotiledônea com adaptação a este metabolismo.

São necessários vários estudos adicionais, principalmente com diferentes espécies do gênero, levando-se em conta aspectos estruturais e fisiológicos, para melhorar o processo de identificação das espécies, determinar e isolar os prováveis princípios ativos para o uso medicinal, e encontrar alternativas de conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- \_\_\_\_\_. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia do Brasil - Região Centro-Oeste**. Rio de Janeiro, 1988.
- \_\_\_\_\_. IPEMA – Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica. Conservação da biodiversidade da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo. Disponível em – <http://www.biodiversitar.org.br/florabr/ES-especies-ameacadas.pdf>; acessado em 28/02/2007.
- ALVINO, F. O.; SILVA, M. F. & RAYOL, B. P. Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona bragantina, Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 35(4), p. 413-420. 2005.
- ANDRADE, V. C. DE. **O gênero Clusia L. (Clusiaceae Lindley) no Estado de Pernambuco (Brasil)**. Recife: Tese de Mestrado. 1987
- ANDRADE, V. C. DE; MARIZ, G; CAVALCANTI, L. H. & ANDRADE, L. H. C. Distribuição das espécies do gênero *Clusia* L. (Clusiaceae) Pernambuco. In: Tabarelli, M. & Silva, J. M. C (Org.) **Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco, Recife**. Pernambuco: sectma – fundaj. 2002.
- ANDRADE-LIMA, D. DE; MAULE, A. F.; PEDERSEN, T. M. & RAHN, K. Marcgrave Brazilian Herbarium Collected 1638-44. **Botanisk Tidsskrift**, v. 71, p. 121-160. 1977.
- ASCENSÃO, L. **Técnicas Histoquímicas Convencionais e de Microscopia de Fluorescência Aplicadas em Espécies de Cerrado**. Univ. Est. Campinas: Apostila. 2003.
- ASSIS, A. M. DE; PEREIRA, O. J. & THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vimha, Setiba município de Guarapari (ES). **Revista Brasil. Bot.**, v. 27(2), p. 349-361. 2004.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, v.1 LTC/EDUSP Editora da Universidade de São Paulo. 1978.
- BARTHOLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F. THEISEN, I. & WILHELMI, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 126, p. 237-260. 1998.
- BERG, A.; ORTHEN, B.; MATTOS DE E. A.; DUARTE, H. M. & LÜTTGE, U. Expression of crassulacean acid metabolism in *Clusia hilariana* Schlechtendal in different stages of development in the field. **Trees**, v. 18, p. 553-558. 2004.
- BERGMAYER, H. U. & BRENT, E. Methods of Enzymatic analysis, In: Bergmeyer HU, editors, Verlag Chemie Weinhein, New York: Academic Press, p. 735-760. 1974.
- BOEGER, M. R. T.; ALVES DE BRITO, C. J. F. & NEGRELLE, R. R. B. Relação entre características morfo-anatômicas foliares e esclerofilia em oito espécies arbóreas de um trecho de floresta pluvial Atlântica. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 40 (2), p. 493-503. 1997.
- BORLAND, A. M.; TECSI, L. I.; LEEGOOD, R. C. & WALKER, R. P. Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical

- characterization and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. **Planta**, v. 205, p. 342-351. 1998.
- BOZZOLA, J. J. & RUSSEL, L. D. **Electron Microscopy**: principles and techniques for biologists. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1992.
- BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, v. 13, p. 115-155. 1965.
- CAO, K. F. Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean heath forest. **Canadian Journal Botany**, v. 71(10), p. 1245-1253. 2000.
- CAREY, G. Comparative anatomy of leaves from species in two habitats around Sidney. **Proc. Linn. Soc. N. S. Wales**, v.63 (5/6), p. 439-450. 1938.
- CARLQUIST, S. **Comparative Plant Anatomy**. New York: Holt, Rinehart and Winston. 1961.
- CARMO, R. M. & FRANCESCHINELLII, E. V. Polinização e biologia floral de *Clusia narrudae* Planchon & Triana (Clusiaceae) na Serra da Calçada, município de Brumadinho, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25(3), p. 351-360. 2002.
- CHABOT, B. F.; JURIK, T. W. & CHABOT, J. F. Influence of instantaneous and integrated light-flux density on leaf anatomy and photosynthesis. **American Journal of Botany**, v. 66(8), p. 940-945. 1979.
- COOPER-DRIVER, G. A & BHATTACHARYA, M. Role of phenolics in plant evolution. **Phytochemistry**, v. 40(5), p. 1165-1174. 1998.
- CORRÊA, P. M. **Diccionario das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas por M. Pio Corrêa**. v. 2 .RJ Ministério da Agricultura. 1931.
- CORREIA, M. C. R.; ORMOND, W. T.; PINHEIRO, M. C. B. & LIMA, H. A. Estudo da biologia floral de *Clusia criuva* Camb. Um caso de minetismo. **Bradea**, v. 6(24), p. 209-219. 1993.
- CROXDALE, J. L. Stomatal patterning in angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 87(8), p. 1069-1080. 2000.
- CURTIS, J. D. & LERSTEN, N. R. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. Perforatum* L. And *H. Balearicum* L. **New Phytologist**, v. 114(4), p. 571-580. 1990.
- CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal – Parte I Células e Tecidos**. São Paulo: Rocca, 2ª edição. 1986a.
- CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal – Parte II Órgãos Experimentos e Interpretação**. São Paulo: Rocca. 1986b.
- D'ARCY, W. G. D & KEATING, R. C. Anatomical support for the taxonomy of *Calophyllum* (Guttiferae) in Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 66 (3), p. 557-571. 1979.
- DENTON, M. F. SEM analysis of leaf epicuticular waxes of *Sedum* section *Gormanina* (Crassulaceae). **Brittonia**, v. 46(4), p. 296-308. 1994.

- DÍAZ-CARBALLO, D.; SEEBER, S.; STRUMBERG D. & HILGER, R. A. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutic**, v. 41(12), p. 622-623. 2003.
- DICKISON, W. C. & WEITZMAN, A. L. Comparative anatomy of the young stem, node, and leaf of Bonnetiaceae, including observations on a foliar endodermis. **American Journal of Botany**, v. 83(4), p. 405-418. 1996.
- DUNN, D. B.; SHARMA, G. K. & CAMPBELL, C. C. Stomatal patterns of dicotyledons and monocotyledons. **American Midland Naturalist**, v. 74(1), p. 185-195. 1965.
- EAMES, A. J. & MACDANIELS, L. H. **An Introduction to Plant Anatomy**. New York: McGraw-Hill. 1947.
- ECKERSON, S. H. The number and size of the stomata. **Botanical Gazette**, v.46 (3), p. 221-224. 1908.
- ENDT, D. V.; KIJNE, J. W. & MEMELINK, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? **Phytochemistry**, v. 61, p. 107-114. 2002.
- ESAU, K. **Anatomia das Plantas com Sementes**; tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgard Blucher. 1974.
- ESPÍRITO SANTO, A. DO & PUGIALLI, H.R.L. Estudo da plasticidade anatômica de *Stromanthe thalia* (Vell.) J.M.A. Braga (Marantaceae) em dois ambientes de Mata Atlântica. **Rodriguésia**, v. 50(76/77), p.109-124. 1999.
- EVANS, J. R. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO<sub>2</sub> between chloroplasts. **New Phytologist**, v. 143, p. 93-104. 1999.
- FAHN, A. **Anatomia Vegetal**. Madrid: Pirstarchs. 1982.
- FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New Phitol**, v. 108, p. 229-257. 1988.
- FAHN, A. Structure and Function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 37-75. 2000.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.**, v. 55(1), p. 123-142. 1968.
- FIGLIUOLO, R. A floresta e os produtos químicos naturais. **Acta Amazônica**, v. 9(4), p. 165-172. 1979.
- FIGUEIRÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A. & SIMABUKURO, E. A. Crescimento de folhas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta bot. bras.**, v. 18 (3), p. 573-580. 2004.
- FINLEY, D. S. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. **Revista de Biologia Tropical**, v. 47(12), p. 27-31. 1999.
- FRANCO, A. C.; BALL, E. & LÜTTGE, U. Patterns of gas exchange and organic oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. **Oecologia**, v. 85, p. 108-114. 1990.
- FRANCO, A. C.; OLIVARES, E.; BALL, E.;LUTTGE, U. & HAAG-KERWER, A. In situ studies of crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of the genus *Clusia*. **New Phytol**, v. 126, p. 203-211. 1994.

- GEESKE, J.; APLET, G. & VITOUSEK, P. M. Leaf morphology along environmental gradients in hawaiian *Metrosideros polymorpha*. **Biotropica**, v. 26(1), p. 17-22. 1994.
- GEHRIG, H. H.; ARANDA, J.; CUSHMAN, M. A.; VIRGO A.; CUSHMAN, J.C.; HAMMEL, B. E. & WINTER, K. Cladogram of Panamanian *Clusia* based on nuclear DNA: implications for the origins of crassulacean acid metabolism. **Plant biol.**, v. 5, p. 59-70. 2003.
- GINDEL, I. Stomatal number and size as related to soil moisture in tree xerophytes in Israel. **Ecology**, v. 50(2), p. 263-267. 1968.
- GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 63-92. 1988.
- GONZÁLEZ, M. G. & MATAMOROS, O. M. Efecto del extracto acuoso de las hojas de "copey", *Clusia coclensis* (Clusiaceae) sobre la respuesta del reflejo barorreceptor en ratas. **Journal of the Tropical Biology**, v. 45(3), p. 993-998. 1997.
- GOULET, F. & BELLEFLEUR, P. Leaf morphology plasticity in response to light environment in deciduous tree species and its implication on forest succession. **Canadian Journal of Forest Research**, v.16, p. 1192-1195. 1986.
- GUSTAFSSON, M. H. Floral morphology and relationships of *Clusia gundlachii* with a discussion of floral organ identity and diversity in the genus *Clusia*. **Int. J. Plant Sci.**, v. 161(1), p. 43-53. 2000.
- GUSTAFSSON, M. H. G.; BITTRICH, V. & STEVENS, F. Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences. **Internationa Journal of Plant Sciences**, v. 163, p.1045–1054. 2002.
- HAAG-KERWER, A.; FRANCO, A. C. & LÜTTGE, U. The Effect of Temperature and Light on Gas Exchange and Acid Accumulation in the C<sub>3</sub>-CAM Plant *Clusia minor* L. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p. 345-352. 1992.
- HABERLANDT, G. **Physiological Plant Anatomy**. Londres: MacMillan. 1928.
- HANBA, Y. T.; KOGAMI, H. & TERASHIMA, I. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant, Cell and Environment**, v. 25(8), p. 1021-1030. 2002.
- HELBSING, S.; RIEDERER, M. & ZOTZ, G. Cuticles os vascular epiphytes: efficient barriers for water loss after stomatal closure?. **Annals of Botany**, v. 86, p. 765-769. 2000.
- HERRMANN, K. M. & WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503. 1999.
- HERZOG, B.; GRAMS, T. E. E.; HAAG-KERWER, A.; BALL, E.; FRANCO, A.C. & LUTTGE,U. Expression of modes of photosynthesis (C-3, CAM) in *Clusia criuva* Camb. in a Cerrado gallery forest transect. **Plant Biology**, v. 1, p. 357-364. 1999.
- HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la sociedad Argentina de Botánica**, v. 16(2), p. 1-26. 1974.
- HICKEY, L. J. **A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves**. p. 25-39, In Metcalfe, C. R., & Chalk, L. (eds), *Anatomy of the Dicotyledons*.

- Second Edition. v.1. Systematic Anatomy of Leaf and Stem, With a Brief History of the Subject. Oxford: Clarendon Press. 1979.
- HUTCHINSON, J. **Evolution and Phylogeny of Flowering Plants. Dicotyledons: Fact and Theory**. Londres: Academic Press. 1969.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practices**. San Francisco: W.H. Freeman. 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book. 1940.
- JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 387-398. 1998.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S. ; KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1999.
- JUSTO, C. F.; SOARES, A. M.; GAVILANES, M. L. & CASTRO, E. M. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Bot. Bras.**, v.19(1), p. 111-123. 2005.
- KAISER, E. Verfahren zur Herstellung Einer Tadellosen Glycerin – Gelatine. **Botanisch Zentralb**, v. 180, p. 25-26. 1880.
- KAUL, R. B. The role of the multiple epidermis in foliar succulence of Peperomia (Piperaceae). **Botanical Gazette**, v. 138(2), p. 213-218. 1977.
- KOROLEVA, O. A.; FARRAR, J. F.; TOMOS, A. D. & POLLOCK, C. J. Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. **New Phytologist**, v. 136(1), p. 97-104. 1997.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. **Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR. 1997.
- LANGERON, M. **Précis de Microscopie**, ed. 7. Paris: Masson & Cie. 1949.
- LEVIN, D. A. Plant phenolics: an ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 105(942), p. 157-181. 1971.
- LINDER, S. A proposal for the use of standardised methods for chlorophyll determination in ecological and ecophysiological investigations. **Physiologica Plantarum**, v. 32, p. 154-156. 1974.
- LIS, R. A. Leaf architectural survey of *Cercocarpus* (Rosaceae) and its systematic significance. **International Journal of Plant Sciences**, v. 153(2), p. 258-272. 1992.
- LUQUE, R.; SOUSA, H. C. & KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) – modificado – e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. **Acta bot. Bras.**, v. 10(2), p. 199-212. 1996.
- MACHADO, M.M.P. **Estudo sobre a anatomia foliar de *Clusia lanceolata* Cambess**. Rio de Janeiro: Tese de Mestrado. 1980.
- MACHADO, M. M. P. & EMMERICH, M. Presença de coléteres em *Clusia lanceolata* Cambess. **Bol. Mus. Nac. Bot.**, v. 59, p. 1-7. 1981.



- MAGUIRE, B. A revision of *Clusia* L. section Cochlanthera (Choisy) Engler. **Caldasia**, v. 11(55), p. 129-146. 1977.
- MARIZ, G. Chaves para as espécies de *Clusia* nativas no Brasil. **Mem. Inst. Bioc. Univ. Fed. Pe.**, v. 1(1), p. 249-314. 1974.
- MARIZ, G. & WEINBERG, B. *Clusia spiritu-sanctensis* uma espécie nova de Guttiferae. **Bradea**, v. 3(29), p. 223-228. 1982.
- MEDINA, G.; AGUIAR, G.; GÓMEZ, M. & MEDINA, J. D. Patterns of leaf epicuticular waxes in species of *Clusia*: taxonomical implications. **Interciencia**, v. 29 (10), p. 579-582. 2004.
- MESQUITA, R. C. G. & FRANCISCON, C. H. Flower visitors of *Clusia nemorosa* G. F. W. Meyer (Clusiaceae) in an amazonian white-sand campina. **Biotropica**, v. 27, p. 254-258. 1995.
- METCALFE, C. R. **Secretes mineral substances**, pp.82-97. In C. R. Metcalfe & L. Chalk, *Anatomy of the dicotyledons*, v. II, Oxford: Clarendon Press. 1983.
- METCALFE C. R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**, v. II, Oxford: Clarendon Press. 1983.
- MONTENEGRO, G. JORDAN, M. & ALJARO, E. Interactions between Chilean matorral shrubs and phytophagous insects. **Oecologia**, v. 45, p. 346-349. 1980.
- MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes – padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. 1972.
- MORRETES, B. L. DE & FERRI, M.G. Contribuições ao conhecimento da anatomia de folhas de uma “caatinga” do Rio Negro (Amazonas). **Revista de Biologia**, v. 8(1-4), p. 97-122. 1972.
- MUENSCHER, W. L. C. A study of the relation of transpiration to the size and number of stomata. **American Journal of Botany**, v. 2(9), p. 487-504. 1915.
- NIINEMETS, Ü. Distribution of foliar carbon and nitrogen across the canopy of *Fagus sylvatica*: adaptation to a vertical light gradient. **Acta Oecologica**, v. 16, p. 525-541. 627-635. 1995.
- NOGUEIRA, P. C.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G. J.; LOPES, A. V. & MARSAIOLI, A. J. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, v. 56(5), p. 443-452. 2001.
- OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. M.; BITTRICH, I. V. & MARSAIOLI, A. J. Floral resin of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, v. 37(36), p. 6427-6430. 1996.
- PAIVA, J. G. A; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P. & GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral 500\*: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, p. 257- 264. 2006.
- PAULA, J. E. DE. Notas sobre anatomia de *Clusia grandiflora* Splitg. (Guttiferae). **Inst. Nac. Pesq. Amaz. Bot.**, v. 22, p. 1-24. 1966.
- PAULA, J. E. DE. Anatomia de madeira. *Guttiferae*. **Acta Amazônica**, v. 4(1), p. 27-64. 1974a.

- PAULA, J. E. DE. Estômatos de *Guttiferae* – estudo morfológico, dimensional e quantitativo. **Acta Amazônica**, v. 4(1), p. 23-39. 1974b.
- PAULA, J. E. DE. Anatomia de *Lorostemon coelhoi* Paula, *Caraipa valioi* Paula e *Clusia* aff. *macropoda* Klotzch. **Acta Amazônica**, v. 6(3), p. 273-291. 1976.
- PAVIANI, T. I. Anatomia vegetal e Cerrado. **Ciência e Cultura**, v. 30(9), p. 1076-1986. 1978.
- PAVIANI, T. I. Situação da anatomia ecológica no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 36(6), p. 927-932. 1984.
- PIPOLY, J. J.; KEARNS, D. M. & BERRY, P. E. *Clusia*. In **Flora of the Venezuelan Guayana**, v.4, Caesalpiniaceae-Ericaceae (Berry, P. E.; Holst, B. K.; Yattskievych, K., eds.), St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press, p. 260-294. 1998.
- PIZZOLATO, T. D. Staining of Tilia Mucilages with Mayer's Tannic Acid-Ferric Chloride. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 104(3), p.277-279. 1977.
- PLANCHON, J. & TRIANA, J. Memoire sur la famille dès Guttifères. Annales des Sciences Naturelles. Paris. 1860. In: Andrade, V. C. de. **O gênero Clusia L. (Clusiaceae Lindley) no Estado de Pernambuco (Brasil)**. Recife: Tese de Mestrado. 1987
- POSER, G. L. & MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P. De; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. 2001.
- PREISS, J. & SIVAK, M. N. Starch synthesis in sinks and sources. In: Zamsky, E. & Schaffer, A. A. **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker Inc. 1996.
- PRYCHID, C. J. & RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: structure and systematics. **Annals of Botany**, v. 84(6), p. 725–739. 1999.
- PYYKKÖ, M. The leaf anatomy of east Patagonian xeromorphic plants. **Ann. Bot. Fenn.**, v. 3(4), p. 453-622. 1966.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1996.
- ROBERTS, A.; BORLAND, A. M.; MAXWELL, K. & GRIFFITHS, H. Ecophysiology of the C-3-CAM intermediate *Clusia minor* L. in Trinidad: seasonal and short-term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 49(326), p. 1563-1573. 1998.
- ROTH-NEBELSICK, A.; UHL, D.; MOSBRUGGER, V. & KERP, H. Evolution and function of leaf venation architecture: a review. **Annals of Botany**, v. 87, p. 553-566. 2001.
- SACK, F. & PAOLILLO, Jr., D. J. Structure and development os walls in *Funaria* stomata. **American Journal of Botany**, v. 70(7), p. 1019-1030. 1983.
- SALATINO, A.; MONTENEGRO, G. & SALATINO, M. L. F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 117-124. 1986.

- SCHNEIDER, S. Z. **Anatomia foliar de *Clusia hilariana* Schlecht. e *Clusia spiritus-sanctensis* G. Mariz et Weinberg (Guttiferae) ocorrentes no estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Tese de Mestrado. 1985.
- SCHREIBER, L. & RIEDERER, M. Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. **Oecologia**, v. 107, p. 426-432. 1996.
- SILVA, A. G. DA & WEINBERG, B. *Clusia marizii*, uma nova espécie de Guttiferae para o Espírito Santo, Brasil. **Bradea**, v. 4(4), p. 21-26. 1984.
- SILVA, A. G. DA & WEINBERG, B. *Clusia aemygdioi*, uma nova espécie de Guttiferae do Espírito Santo, Brasil. **Bradea**, v. 4(24), p. 161-164. 1985.
- SKOSS, J. D. Structure and composition of plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. **Botanical Gazette**, v.117, p. 55-72. 1955.
- SOBRADO, M. A. & MEDINA, E. General morphology, anatomical structure, and nutrient content of sclerophyllous leaves of the "Bana" vegetation of Amazonas. **Oecologia**, v. 45, p. 341-345. 1980.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, v. 1. 1908.
- SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia. 1998.
- STACE, C. A. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. **Bull. British Mus. Nat. Hist.**, v. 4, p. 3-78. 1965.
- STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. version 7, 2006; acessado em 26/02/2007.
- TING, I. P.; HANN, J.; HOLBROOK, N. M.; PUTZ, F. E.; STERNBERG, L. DA S. L.; PRICE, D. & GOLDSTEIN, G. Photosynthesis in hemiepiphytic species of *Clusia* and *Ficus*. **Oecologia**, v. 74, p. 339-346. 1987.
- TING, I. P.; LORD, E. M.; STERNBERG, L. DA S. L. & DENIRO, M. J. Crassulacean acid metabolism in the strangler *Clusia rosea* Jacq. **Science**, v. 229, p. 969-971. 1985.
- VAN COTTLEM, W. A classification of stomatal types. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 63, p. 235-246. 1970.
- VESQUE, J. La tribu des Clusiées. *Journal de Botanique*, v. 7(1), p. 69-72. 1893. In: Schneider, S.Z. **Anatomia Foliar de *Clusia hilariana* Schlecht. e *Clusia spiritus-sanctensis* G. Mariz et Weinberg (Guttiferae) Ocorrentes no Estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Tese de Mestrado. 1985.
- VIEIRA, C. M. & SILVA, A. G. *Clusia studartiana*, uma nova espécie de Clusiaceae para o Rio de Janeiro, Brasil. **Bradea**, v. 6(10), p. 69-73. 1992.
- VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I. & CARELI, M. L. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4(2), p. 99-105. 1992.

- WILKINSON, H. P. **The plant surface (mainly leaf)**. In C. R. Metcalfe & L. Chalk, *Anatomy of the dicotyledons*, v. II, Oxford: Clarendon Press. 1983.
- WYLIE R. B. Differences in foliar organization among leaves from four locations in the crown of an isolated tree (*Acer platanoides*). **Proc. Iowa Acad. Sci.**, v. 56, p. 189-198. 1949.
- YAMASHITA, N.; KOIKE, N. & ISHIDA, A. Leaf ontogenetic dependence of light acclimation in invasive and native subtropical trees of different successional status. **Plant, Cell and Environment**, v. 25(10), p. 1341-1356. 2002.
- YÁÑEZ-ESPINOSA, L.; TERRAZAS, T.; LÓPEZ-MATA L. & VALDEZ-HERNÁNDEZ, J. I. Leaf trait variation in three species through canopy strata in a semi-evergreen Neotropical forest. **Canadian Journal of Botany**, v. 81(4), p. 398–404. 2003.
- YANG, ZR. & LIN, Q. Comparative morphology of the leaf epidermis in *Schisandra* (Schisandraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 148, p. 39-56. 2005.