

# Estruturas secretoras em folha e caule de *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae)<sup>1</sup>

 [Maria Júlia Camillo Silva Franco](#)<sup>2,3</sup> e Adriana Lenita Meyer Albiero<sup>2</sup>

Recebido: 10.10.2017; aceito: 28.06.2018

**ABSTRACT** - (Secretory structures in leaf and stem of *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. and *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae)). The secretory structures of Rutaceae are of great importance due to the economic interest in the drug precursors usually stored and/or produced by them. There is considering this, the characterization of stem and leaf secretory structure of *Esenbeckia febrifuga* and *Esenbeckia grandiflora* was carried out, emphasizing the ontogenesis of the cavities and the peltate trichome (in *E. febrifuga*). Oil-secreting cavities, glandular trichomes and idioblasts with oil, alkaloids, and calcium oxalate crystals were observed. These elements are distributed randomly in the analyzed organs, being more abundant in the younger ones. Glandular trichomes with a secreting head and tetramerous symmetry were observed for the first time in species of Rutaceae. The cavities have a subepidermal origin and eschizolysigenic development, as seen in other species of the same subtribe. Through the ultrastructural analyses of the cavities, were registered the eccrine, the granulocrine, and the holocrine processes of secretion, which are common in secretory structures. This set of characteristics is valuable for future taxonomic studies with the group.

**Keywords:** glandular trichomes, idioblasts, medicinal plants, ontogenesis, secretory cavities

**RESUMO** - (Estruturas secretoras em folha e caule de *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae)). As estruturas secretoras das rutáceas possuem grande importância, uma vez que existe interesse econômico nos precursores de fármacos geralmente armazenados e/ou produzidos por estas. Sendo assim, foi realizada a caracterização das estruturas secretoras do caule e da folha de *Esenbeckia febrifuga* e *Esenbeckia grandiflora*, enfatizando a ontogênese das cavidades e do tricoma peltado (em *E. febrifuga*). Foram observadas cavidades secretoras de óleo, tricomas glandulares e idioblastos com óleos, alcaloides e cristais de oxalato de cálcio. Esses distribuem-se aleatoriamente nos órgãos analisados, sendo mais abundantes nos órgãos jovens. Tricomas glandulares com cabeça secretora e simetria tetrâmera foram observados pela primeira vez em espécies de Rutaceae. As cavidades observadas possuem origem subepidérmica e desenvolvimento esquizolisígeno, assim como outras espécies da mesma subtribo. Foram registrados processos de secreção écrino, granulócrino e holócrino, comuns às estruturas secretoras, por meio da análise ultraestrutural das cavidades. Tais características são valiosas para futuros estudos taxonômicos do grupo.

**Palavras-chave:** cavidades secretoras, idioblastos, ontogênese, plantas medicinais, tricomas glandulares

## Introdução

Rutaceae Jussieu, *nom. cons.* é formada por arbustos e árvores, cuja presença de cavidades secretoras de óleo, na folha, no caule e no fruto, é característica constitutiva da família (Metcalf & Chalck 1950, Fahn 1988a, Evert 2006, Judd *et al.* 2009). Devido a essa particularidade, muitos gêneros têm sido amplamente estudados do ponto de vista químico como, por exemplo, *Citrus* L. (Bigoniya & Singh 2014) e *Pilocarpus* Vahl (Mello *et al.* 2007).

A possibilidade de aquisição de compostos precursores de fármacos, de importância econômica agregada, gera o interesse pelo estudo químico dos óleos essenciais e outros metabólitos secundários produzidos e/ou armazenados por estruturas secretoras presentes em espécies pertencentes à Rutaceae. Por vezes, esse estudo negligencia a importância da caracterização de tais estruturas.

Como exemplo, alguns estudos evidenciam as propriedades terapêuticas de duas espécies de *Esenbeckia* Kunth, subtribo Pilocarpinae, que se

1. Parte da Dissertação de Mestrado da primeira Autora

2. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900 Maringá, PR, Brasil

3. Autor para correspondência: [mjcamillos@gmail.com](mailto:mjcamillos@gmail.com)

destacam: *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart. Ambas são arvoretas nativas brasileiras, que ocorrem preferencialmente na Mata Atlântica, bioma de grande interesse de preservação. Ademais, possuem grande potencial fitoquímico e medicinal, como mostram os poucos estudos encontrados sobre elas. *Esenbeckia febrifuga* é utilizada como febrífugo em geral (Lévi-Strauss 1952, Kaastra 1982) e contra a malária (Botsaris 2007, Oliveira *et al.* 2008); e *Esenbeckia grandiflora* possui atividade antibacteriana (Novais *et al.* 2003), atividade larvicida contra o mosquito transmissor da dengue (Oliveira *et al.* 2005) e pode auxiliar no tratamento de psoríase (Parrish *et al.* 1974).

Segundo Judd *et al.* (2009), geralmente, a forma e a distribuição das estruturas secretoras possuem um grande valor taxonômico. Fato que foi bem explorado na discussão do trabalho de Liu & Hu (1998) que descreveram as cavidades secretoras de 40 espécies, dentre 22 gêneros de Rutaceae ocorrentes na China, concluindo que a localização e a estrutura das cavidades eram correlatas em gênero e espécie.

Outro parâmetro anatômico que pode auxiliar nas análises farmacognósticas e taxonômicas de gêneros e espécies próximas é a ontogenia de estruturas secretoras que, no caso das cavidades de Rutaceae, vem sendo amplamente debatida em controvérsias sobre o tipo de formação, se esquizógena ou lisígena, principalmente em *Citrus* (Bosabalidis & Tsekos 1982, Turner *et al.* 1998, Bennici & Tani 2004, Ascensão 2006).

Diante do exposto, neste trabalho, foi realizada a caracterização morfológica e histoquímica das estruturas secretoras presentes em caule e folha de *Esenbeckia febrifuga* e *Esenbeckia grandiflora*, bem como, o estudo ontogênico e ultraestrutural das cavidades e a ontogênese do tricoma glandular peltado, presente em *E. febrifuga*.

### Material e métodos

Material Vegetal - As amostras do material vegetal, registradas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob os números: HUEM 31609 - *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e HUEM 29902 - *Esenbeckia grandiflora* Mart., foram obtidas a partir de cinco coletas na Estação Ecológica do Caiuá no município de Diamante do Norte, PR - BR. O local de coleta é uma Unidade de Conservação (UC) Estadual de Proteção Integral com vegetação natural da Mata Atlântica e formação florestal específica de

Floresta Estacional Semidecidual. De cada coleta foram selecionados materiais em vários estágios de desenvolvimento foliar e caulinar de ambas as espécies: porção mediana de primórdios foliares; de folhas do 1º e 2º nós (nervura, bordo e pecíolo/peciólulo); de folhas do 3º ao 5º nós (bordo, nervura e pecíolo/peciólulo); de caules do 1º e 2º entrenós; e caules do 3º e 4º entrenós. Para microscopia de luz e histoquímica, todas essas porções foram utilizadas. Para Microscopia Eletrônica de Varredura, apenas folhas do 1º e 2º nós e caules do 1º e 2º entrenós. Para Microscopia Eletrônica de Transmissão, apenas primórdios e folhas do 1º e 2º nós.

Microscopia de Luz - O material utilizado na montagem de lâminas semipermanentes foi fixado em FAA 50 por uma semana, reservado em etanol 70 e, a partir daí, foram realizadas secções transversais e longitudinais à mão-livre, com auxílio de lâmina de barbear. Esse material foi montado em Glicerina 33%, tendo sido previamente corado com Safranina e Azul de Astra (Gerlach 1969). Para a confecção de lâminas permanentes, o material primariamente fixado em Glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 foi desidratado em série etílica e em seguida incluído em historresina Technovich 700, segundo Guerrits (1991) e instruções do fabricante. Posteriormente foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo de rotação; corado em Azul de Toluidina (O'Brien *et al.* 1965 - modificado) e montado em Entellan® ou Permount®. Essa técnica de fixação e processamento em historresina foi necessária para obter melhores resultados com os materiais mais delicados, como os primórdios e as folhas jovens. As fotomicrografias foram obtidas a partir de microscópios ópticos Leica, Olympus e Zeiss acoplados a câmera de captura de imagens.

Histoquímica - Os testes histoquímicos foram realizados com a utilização de: Sudan IV para lipídios totais (Johansen 1940); reagente de NADI para óleos essenciais e oleoresinas (David & Carde 1964); solução de Cloreto Férrico a 10% para compostos fenólicos totais (Johansen 1940); reagente de Wagner para alcaloides (Furr & Mahlberg 1981); Lugol para amido (Jensen 1962); Vermelho de Rutênio para pectinas (Johansen 1940); e Ácido Sulfúrico para cristais de oxalato de cálcio (Johansen 1940). Os testes foram realizados de acordo com as recomendações propostas por Ascensão (2003), em três repetições, utilizando material vegetal (folha e caule) fresco e fixado, em secções transversais. Os resultados

foram observados em microscópio óptico Olympus e registrados em tabela.

**Microscopia Eletrônica de Varredura** - Para observação da superfície epidérmica, amostras de material fixado (folha e caule) em solução de Glutaraldeído a 2,5% e em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, foram desidratadas em série alcoólica e submetidas ao “ponto crítico”. Após, foram montadas com fita adesiva dupla face em suporte de alumínio (stub), recobertas com ouro (Robbards 1978) e analisadas e registradas por eletromicrografias em Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu SS-550 Super Scan.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão** - A ultraestrutura das cavidades secretoras foi analisada por meio de amostras foliares fixadas em Glutaraldeído a 2,5% e em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 durante uma semana e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 1 h a 25 °C. Após, as amostras foram desidratadas em série cetônica e embebidas em resina de Araldite® (Machado & Rodrigues 2004) para obtenção de secções semifinas. Após análise e seleção do material em microscópio óptico, secções ultrafinas foram obtidas com uma navalha de diamante Diatome e contrastadas com acetato de uranila e acetato de chumbo (Reynolds 1963). O material final foi examinado e registrado por eletromicrografias em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai Spirit - FEI Company.

## Resultados

**Distribuição, morfologia e histoquímica das estruturas secretoras** - Em ambas as espécies ocorrem estruturas secretoras internas e externas, divididas em três categorias morfológicas distintas: cavidade secretora, idioblasto e tricoma glandular, sendo as duas primeiras internas e a última externa. A ocorrência de estruturas secretoras é maior nos órgãos mais jovens, especialmente nos primórdios foliares (figura 1 a, b). Essas estruturas estão distribuídas no limbo, pecíolo, pecíolulo (apenas em *Esenbeckia febrifuga*) e caule, de ambas as espécies (figura 1 c-i), persistindo até a planta adulta. Em se tratando dos tricomas glandulares, a ocorrência como um todo é maior em *Esenbeckia febrifuga* e não há ocorrência no caule adulto de *Esenbeckia grandiflora*.

Nos órgãos analisados, as cavidades sempre ocorrem próximas à epiderme, sendo que, no limbo de *E. grandiflora*, ocorrem frequentemente mais internamente no clorênquima do que em

*E. febrifuga*. Essas estruturas possuem contorno de esférico a oval, com epitélio multisseriado formado por células de parede delgada, estreitas e alongadas concentricamente, delimitando o lúmen, que possui formato isodiamétrico ou irregular (figura 2a).

Os tricomas glandulares estão inseridos entre as células epidérmicas comuns, raramente em depressões. Estes ocorrem em ambas as faces do limbo foliar, com maior distribuição na face abaxial. Os tricomas são constituídos de três porções: base, pedúnculo e cabeça glandular. Em *E. febrifuga* ocorre o tricoma glandular do tipo peltado (figura 2 b), com a base formada por uma ou duas células epidérmicas inseridas pouco abaixo do nível das demais células. O pedúnculo possui uma ou duas células curtas com paredes laterais espessadas. A cabeça secretora é ampla e alongada no sentido periclinal com quatro a dezesseis células secretoras, dispostas em quatro grupos de células arranjadas em uma única camada (figura 2 c), configurando uma simetria tetrâmera.

Em *E. grandiflora* ocorre o tricoma glandular do tipo capitado (figura 2 d, e). Sua base é formada por uma única célula epidérmica. O pedúnculo contém de duas a quatro células, também com as paredes laterais espessadas. E a cabeça secretora é alongada no sentido anticlinal, contendo de oito a dezesseis células distribuídas em quatro colunas, também em simetria tetrâmera. Este tipo de tricoma foi comumente encontrado nos primórdios foliares.

Os idioblastos encontrados nas espécies analisadas contêm alcaloides, óleos e cristais de oxalato de cálcio (figuras 2 f, g, h - respectivamente). Os idioblastos com alcaloides ocorrem em grande quantidade nas folhas e no caule. Distribuem-se próximos aos feixes vasculares, na epiderme foliar e no córtex peciolar e caulinar. De forma geral, têm maior incidência em *E. grandiflora*. O conteúdo ocupa todo o citoplasma e a parede é espessada (figura 2 f). Possuem formato esférico ou oval e seu tamanho é indiferenciado das demais células.

Os idioblastos oleíferos são escassos e ocorrem próximos às cavidades em ambas as espécies. Seu conteúdo secretado nem sempre preenche totalmente o citoplasma (figura 2 g). Não se observou espessamento da parede celular ou diferença morfológica significativa entre esse tipo de idioblasto e as células comuns.

As células com cristais de oxalato de cálcio, indiferenciadas das células comuns, ocorrem nos primórdios foliares com cristais na forma de ráfides e prismas em grande quantidade (figura 2h). Os cristais prismáticos se mantêm até a planta adulta.

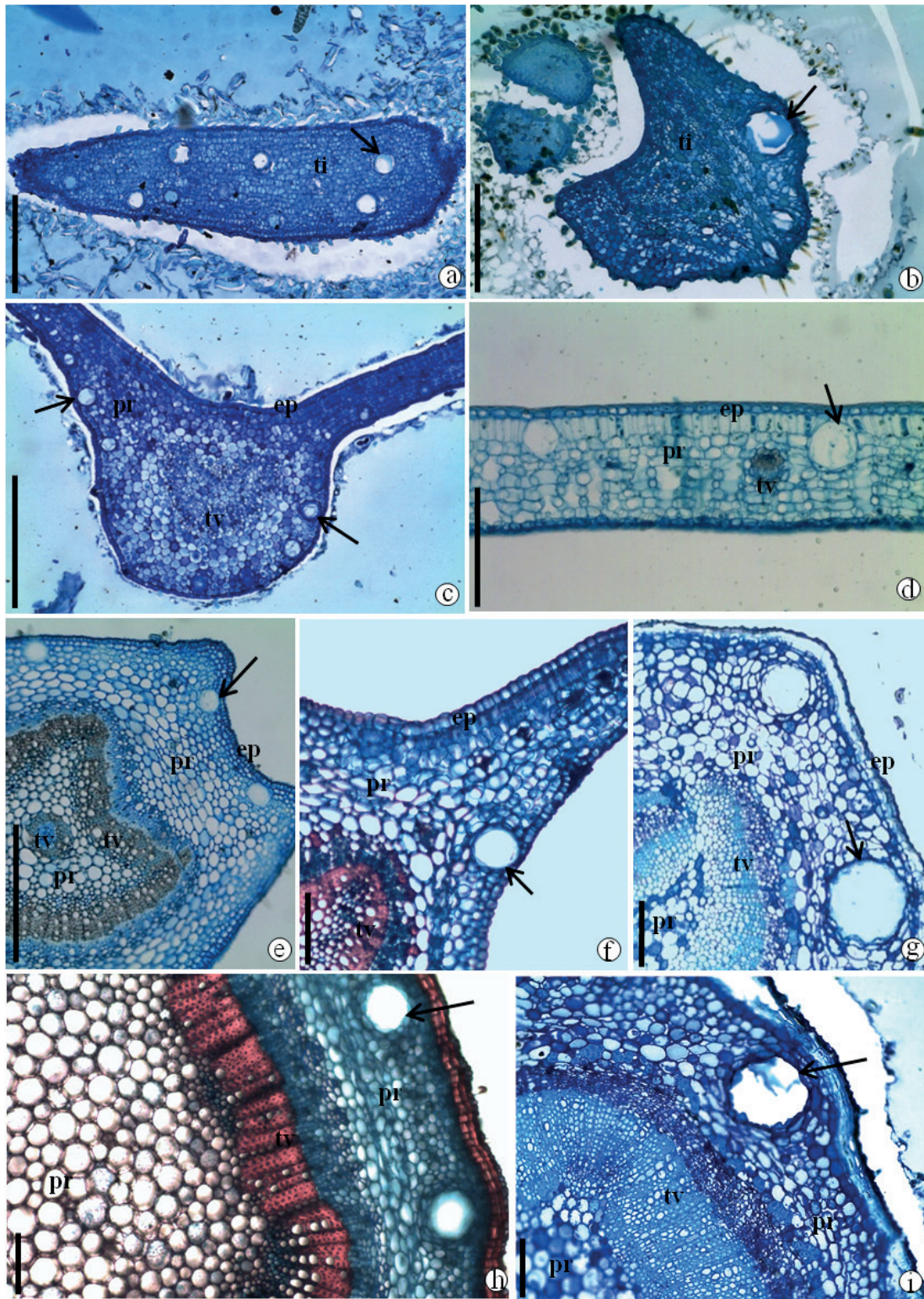


Figura 1. Distribuição das cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos. (a, c, e, f, h) *Esenbeckia febrifuga*. (b, d, g, i) *Esenbeckia grandiflora*. (a) Corte longitudinal. (b-i) Cortes transversais. (a, b) Primórdios foliares. (c,d) Limbo. (e, g) Pecíolo. (f) Pecíolulo. (h, i) Caule. Setas: cavidades secretoras, ti: tecido indiferenciado, ep: epiderme, pr: parênquima, tv: tecido vascular. Barras: (a-e) 25  $\mu$ m; (f-i) 10  $\mu$ m.

Figure 1. Distribution of the secretory cavities in the aerial vegetative organs. (a, c, e, f, h) *Esenbeckia febrifuga*. (b, d, g, i) *Esenbeckia grandiflora*. (a) Longitudinal section. (b-i) Cross sections. (a, b) Leaf primordium. (c, d) Leaf blade. (e, g) Petiole. (f) Petiolule. (h, i) Stem. Arrows: secretory cavities, ti: undifferentiated tissue, ep: epidermis, pr: parenchyma, tv: vascular tissue. Bars: (a-e) 25  $\mu$ m; (f-i) 10  $\mu$ m.

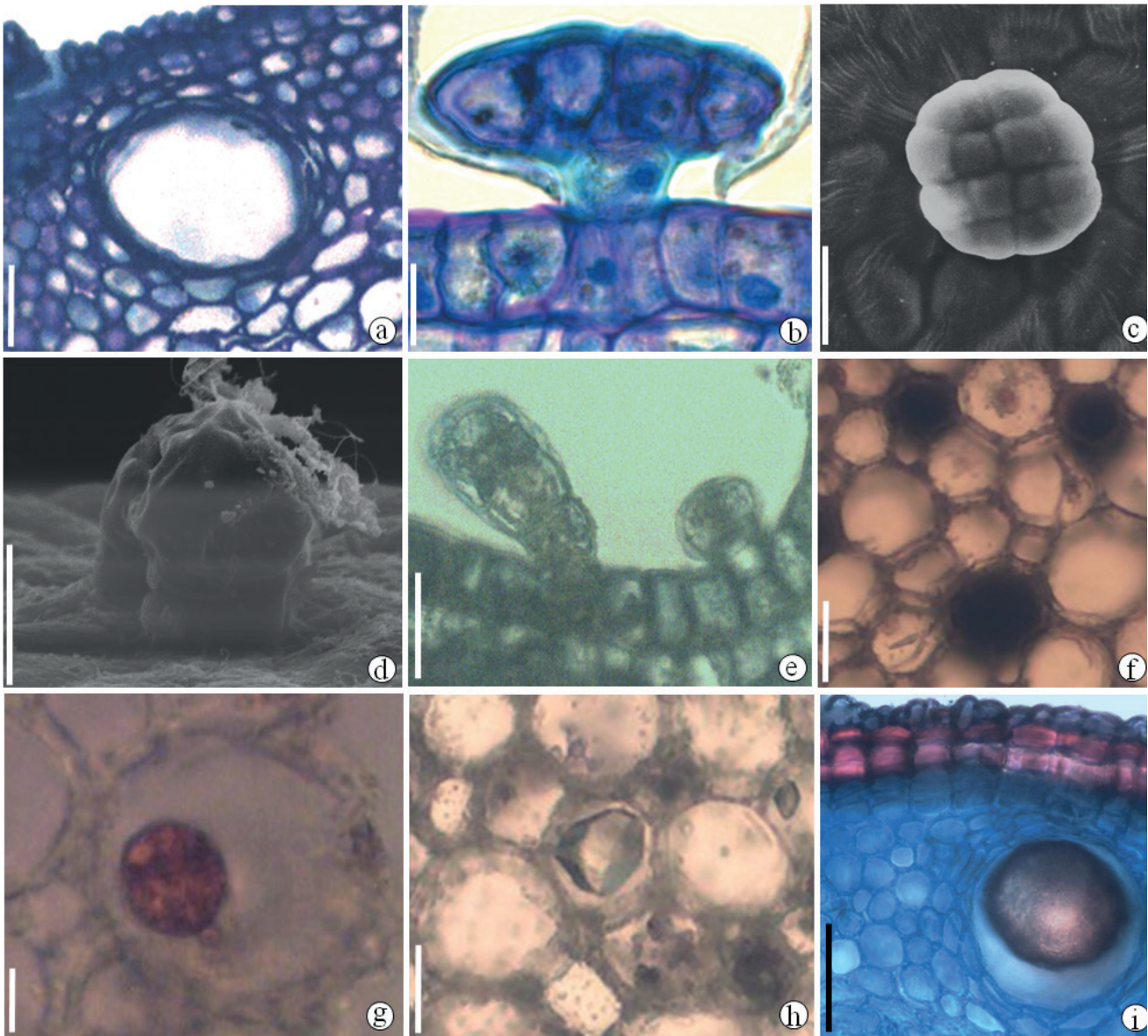


Figura 2. Tipos de estruturas secretoras encontradas em *Esenbeckia febrifuga* e *Esenbeckia grandiflora*. (a, b, e-i) Cortes transversais. (c, d) Superfície epidérmica. (a) Cavidade secretora de formato oval próxima à epiderme abaxial da nervura central, evidenciando o epitélio multisseriado. (b, c) Tricoma glandular peltado de *Esenbeckia febrifuga* na epiderme foliar em vista lateral e vista frontal em MEV, respectivamente, evidenciando a cabeça secretora com quatro grupos de células. (d, e) Tricoma glandular capitado de *Esenbeckia grandiflora* em vista lateral (curvado), na epiderme foliar em MEV e no primórdio foliar, respectivamente. (f) Idioblasto de alcaloide na região medular do caule. (g) Idioblasto oleífero no pecíolo. (h) Idioblasto com cristal prismático de oxalato de cálcio na região cortical do caule. (i) Cavidade secretora repleta de secreção mista na região cortical do caule. Barras = (a, c, i) 10  $\mu\text{m}$ ; (b, e, f, h) 5  $\mu\text{m}$ ; (d) 15  $\mu\text{m}$ ; (g) 1  $\mu\text{m}$ .

Figure 2. Types of secretory structures found in *Esenbeckia febrifuga* and *Esenbeckia grandiflora*. (a, b, e-i) Cross sections. (c, d) Epidermal surface. (a) Oval-shaped secretory cavity near the abaxial epidermis of the central vein, evidencing the multiseriate epithelium. (b, c) Epidermal peltate glandular trichome of *Esenbeckia febrifuga* under SEM, in lateral and frontal view, respectively, showing the secretory head with four groups of cells. (d, e) Capitate glandular trichome of *Esenbeckia grandiflora* in lateral view (curved), on the foliar epidermis under SEM, and in the leaf primordium, respectively. (f) Alkaloid idioblast in the medullar region of the stem. (g) Oil idioblast in the petiole. (h) Idioblast with a prismatic crystal of calcium oxalate in the cortical region of the stem. (i) Secretory cavity filled with mixed secretion in the cortical region of the stem. Bars = (a, c, i) 10  $\mu\text{m}$ ; (b, e, f, h) 5  $\mu\text{m}$ ; (d) 15  $\mu\text{m}$ ; (g) 1  $\mu\text{m}$ .

Observaram-se também raras drusas no limbo de *E. grandiflora*.

Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de grãos de amido, fenóis, alcaloides, lipídeos totais e cristais de oxalato de cálcio (tabela 1). Desses compostos, os alcaloides, lipídeos e os cristais foram encontrados em idioblastos. Também foram observadas, em grande quantidade, gotículas de óleo no clorênquima e na região cortical do pecíolo e do caule de ambas as espécies. Segundo os testes, as cavidades secretam um material misto de alcaloides, fenóis e lipídeos (figura 2 i), identificados tanto no lúmen e no epitélio, quanto nas células adjacentes. Óleos essenciais foram encontrados apenas nas cavidades secretoras do caule e, fenóis, apenas nas cavidades do caule de *E. grandiflora*. A reação com ácido sulfúrico identificou a presença de cristais de oxalato de cálcio. Nos testes também foram evidenciadas substâncias pécticas na parede das células dos tricomas glandulares e na sua cutícula (tabela 1).

**Ontogênese das cavidades secretoras** - As cavidades observadas desenvolvem-se desde os primórdios foliares e gemas apicais. Em folhas jovens, foram observados diferentes estágios de desenvolvimento das cavidades lado a lado (figura 3 a).

O processo de diferenciação e formação das cavidades secretoras se dá por meio de uma única célula parenquimática inicial, próxima à epiderme. Seu citoplasma aparenta-se denso, o núcleo aumenta de volume e ocorrem as primeiras divisões anticlinais e periclinais (figura 3 b), formando um aglomerado esférico ou oval (figura 3 c). Em seguida, as células centrais do aglomerado aumentam seu volume citoplasmático e suas paredes se tornam extremamente delgadas. A partir daí, há o início da formação do lúmen por meio do afastamento das células centrais, observando-se o aparecimento de espaços intercelulares (figura 3 d, e), até que a formação do lúmen esteja completa (figura 3 f).

No estágio seguinte encontrado, a cavidade possui a anatomia comumente observada: com contorno oval ou esférico, com epitélio multisseriado formado por células estreitas de parede delgada que se alongam concêntrica e delimitam o lúmen isodiamétrico ou irregular (figura 3 g). Ao longo do processo de secreção, as células internas do epitélio sofrem autólise devido ao desgaste das suas paredes e vão sendo substituídas pelas células das camadas mais exteriores por crescimento intrusivo, ampliando o espaço da cavidade.

No último estágio das cavidades, não há evidências de secreção de óleos e outros compostos, nem de renovação das células mais internas ou restos celulares no lúmen. As cavidades permanecem inativas nos tecidos e não se desintegram.

O padrão ontogênico observado nas cavidades secretoras é semelhante em ambas as espécies.

**Ontogênese do tricoma peltado de *Esenbeckia febrifuga*** - Os tricomas peltados, ocorrentes em *E. febrifuga*, têm origem de uma única célula epidérmica inicial que aumenta sua atividade nuclear e citoplasmática, se dividindo anticlinalmente para formar as células epidérmicas basais (figura 4 a). Seguindo a ontogênese, ocorre mais uma ou duas divisões periclinais formando as células pedunculares (figura 4 b) e a célula precursora da cabeça secretora (figura 4 c). A primeira célula da porção secretora se divide anticlinalmente e as duas células resultantes (figura 4 d) se dividem mais uma vez no mesmo plano, originando quatro células (figura 4 e). Cada uma dessas células constitui um lóbulo da cabeça secretora, que pode se dividir independentemente, formando até quatro células cada um, totalizando dezesseis (figura 4 f).

Na fase seguinte é possível observar o citoplasma denso das células da cabeça do tricoma glandular (figura 4 g). A secreção se acumula no interior das células e no espaço periplasmático reduzido, até que algum estímulo externo rompa a cutícula e as paredes celulares, liberando o conteúdo secretado (figura 4 h). O tricoma, em seu último estágio, possui um formato de cálice com cavidade ampla e irregular, sendo caracterizado pela presença remanescente das células basais e pedunculares, que sustentam a camada de restos celulares da cabeça secretora (figura 4 i). Em alguns casos é possível observar apenas sua impressão deixada na superfície epidérmica.

**Ultraestrutura e processo secretor das cavidades** - As células iniciais das cavidades possuem núcleo grande, muitas mitocôndrias, vacúolos pequenos (figura 5 a), retículo endoplasmático, poliribossomos e plastídios com e sem grãos de amido de assimilação (figura 5 b). O crescimento intrusivo (Figura 5 b) das células epiteliais é observado em um aglomerado de seis células iniciais. Nessa fase ainda não se observam gotas de óleo ou outro tipo de secreção no citoplasma das células. Ocorrem plasmodesmas nas paredes tangenciais das células comuns (figura 5 c). Há o início do afastamento da lamela média entre as células iniciais centrais (figura 5 d).

Tabela 1. Testes histoquímicos aplicados às secções transversais da folha e do caule de *Esenbeckia febrifuga* e *Esenbeckia grandiflora*.  
 Table 1. Histochemical tests applied to the leaf and stem cross sections of *Esenbeckia febrifuga* and *Esenbeckia grandiflora*.

Testes	Compostos Secundários		Primórdio foliar		Limbo		Peciolo		Caule	
	<i>E. febrifuga</i>	<i>E. grandiflora</i>	<i>E. febrifuga</i>	<i>E. grandiflora</i>	<i>E. febrifuga</i>	<i>E. grandiflora</i>	<i>E. febrifuga</i>	<i>E. grandiflora</i>	<i>E. febrifuga</i>	<i>E. grandiflora</i>
Sudan IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reagente de NADI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloroeto Férrico 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reagente de Wágner	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lugol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelho de Rutênio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido Sulfúrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Na cavidade em estágio secretor observa-se o epitélio multisseriado cujas células de paredes gradativamente delgadas em direção ao lúmen, se tornam extremamente afiladas e alongadas (figura 6 a). Na região de transição entre epitélio secretor e células comuns, é possível observar que a parede das células tangenciais à cavidade é espessada e nessas células parenquimáticas encontram-se muitos amiloplastos com amido, diferentemente das células epiteliais (figura 6 b).

As células epiteliais na fase secretora possuem núcleo grande, muitos plastídios sem grana estruturada, além de muitas mitocôndrias, extensivo retículo endoplasmático rugoso e grande quantidade de secreção no protoplasto, como gotas de óleo (figura 6 c). O conteúdo celular do epitélio é misto de substâncias lipofílicas (elétrón-lucente) e hidrofílicas (elétrón-denso) (figura 6 d).

São observadas inúmeras vesículas de conteúdo pouco elétrón-denso nos vacúolos junto à parede das células epiteliais, liberando o conteúdo por exocitose (figura 6 e). Outros conteúdos são transportados entre as células epiteliais em direção ao lúmen, acumulados no citoplasma ou no vacúolo das células mais internas da cavidade e secretados através da membrana plasmática (figura 6 f). Os vacúolos também podem possuir restos membranosos das organelas lisadas, além de conteúdo fibrilar e lipídico (figura 6 g).

Devido aos consecutivos eventos de secreção, a parede celular das células epiteliais que contornam o lúmen se afasta da membrana plasmática, aumentando o espaço periplasmático e se desintegrando aos poucos, eliminando miofibrilas juntamente com os exsudados (figura 6 h). Desse modo, a parede se afila até o ponto de romper-se, causando a autólise celular (figura 6 e).

Há grande quantidade de material osmiofílico, além dos corpos de óleo, nas células epiteliais (figura 6 i) e nas células adjacentes da cavidade, que são transportados entre as células por meio da membrana plasmática (secreção écrina), já que são lipofílicos.

Observou-se que, ao longo do processo secretor, as células epiteliais mais internas sofrem lise e são substituídas pelas células secretoras mais externas formadas por divisões anticlinais seguindo em crescimento intrusivo. Nas extremidades afiladas das células de crescimento intrusivo se acumulam vesículas elétrón-densas (figura 6 i). Algumas células epiteliais mais internas apresentam um contorno irregular, vacúolo grande e mitocôndrias com poucas cristas.

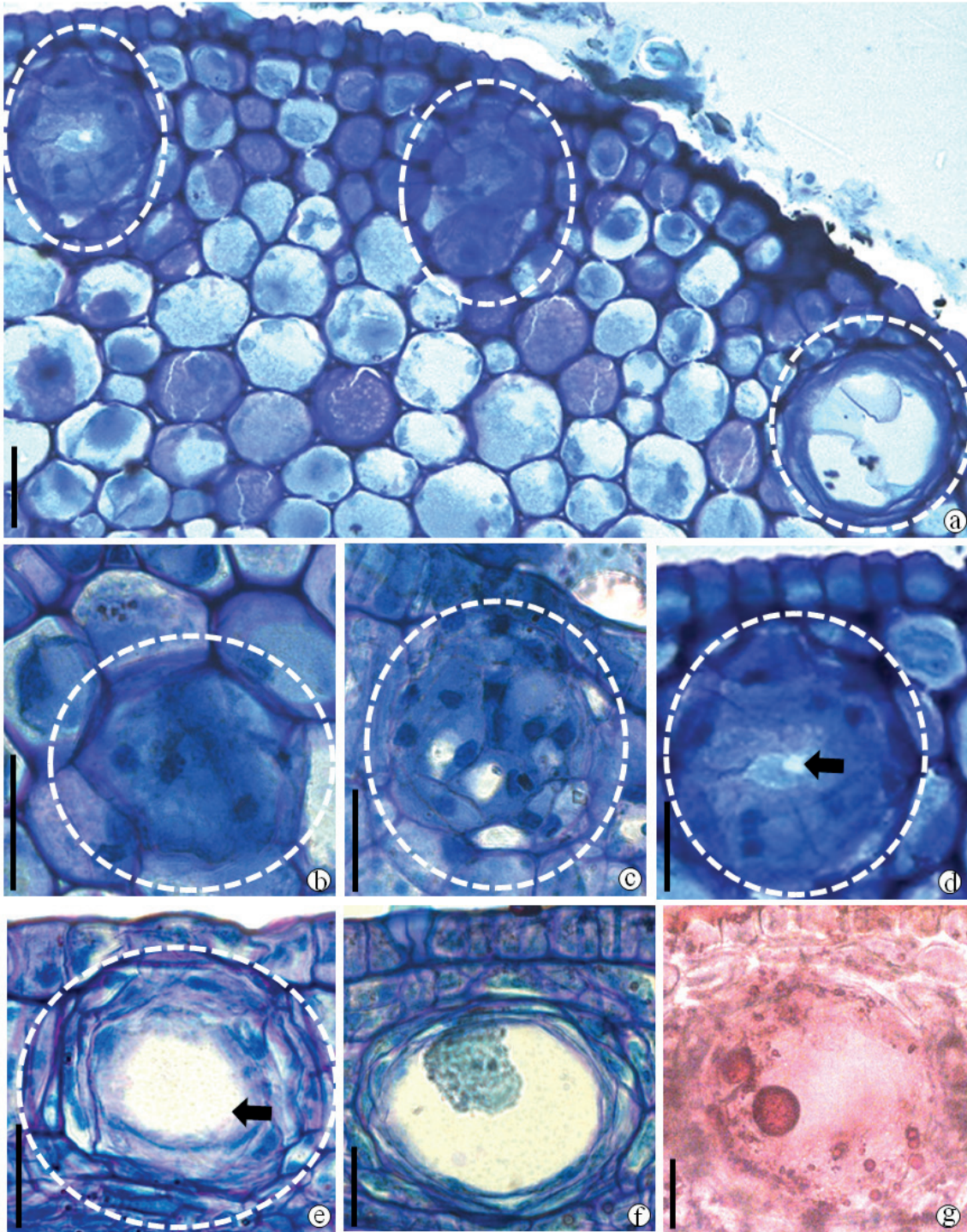


Figura 3. Ontogênese das cavidades secretoras de *Esenbeckia febrifuga* em cortes transversais. (a-f) Folhas jovens. (g) Pecíolo. (a) Diferentes estágios de desenvolvimento das cavidades lado a lado. (b) Células parenquimáticas iniciais. (c) Aglomerado de células iniciais em formato arredondado. (d) Células centrais aumentam de volume e tem-se o início da formação do lúmen da cavidade pelo afastamento de células. (e) Cavidade com lúmen em desenvolvimento. (f) Cavidade madura. (g) Cavidade madura com gotas de óleo no lúmen e no epitélio, reação positiva ao Sudan IV. Setas = lúmen, círculo pontilhado = cavidade secretora em desenvolvimento. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

Figure 3. Ontogenesis of the secretory cavities of *Esenbeckia febrifuga* in cross-section. (a-f) Young leaves. (g) Petiole. (a) Different stages of development of the cavities side by side. (b) Initial parenchymal cells. (c) Agglomerate of initial cells with a rounded shape. (d) Central cells increase in volume and the onset of the cavity's lumen formation is initiated by the spacing of cells. (e) Cavity with developing lumen. (f) Mature cavity. (g) Mature cavity with oil droplets in the lumen and in the epithelium, positive reaction to Sudan IV. Arrows = lumen, dotted circle = developing secretory cavity. Bars = 10  $\mu\text{m}$ .



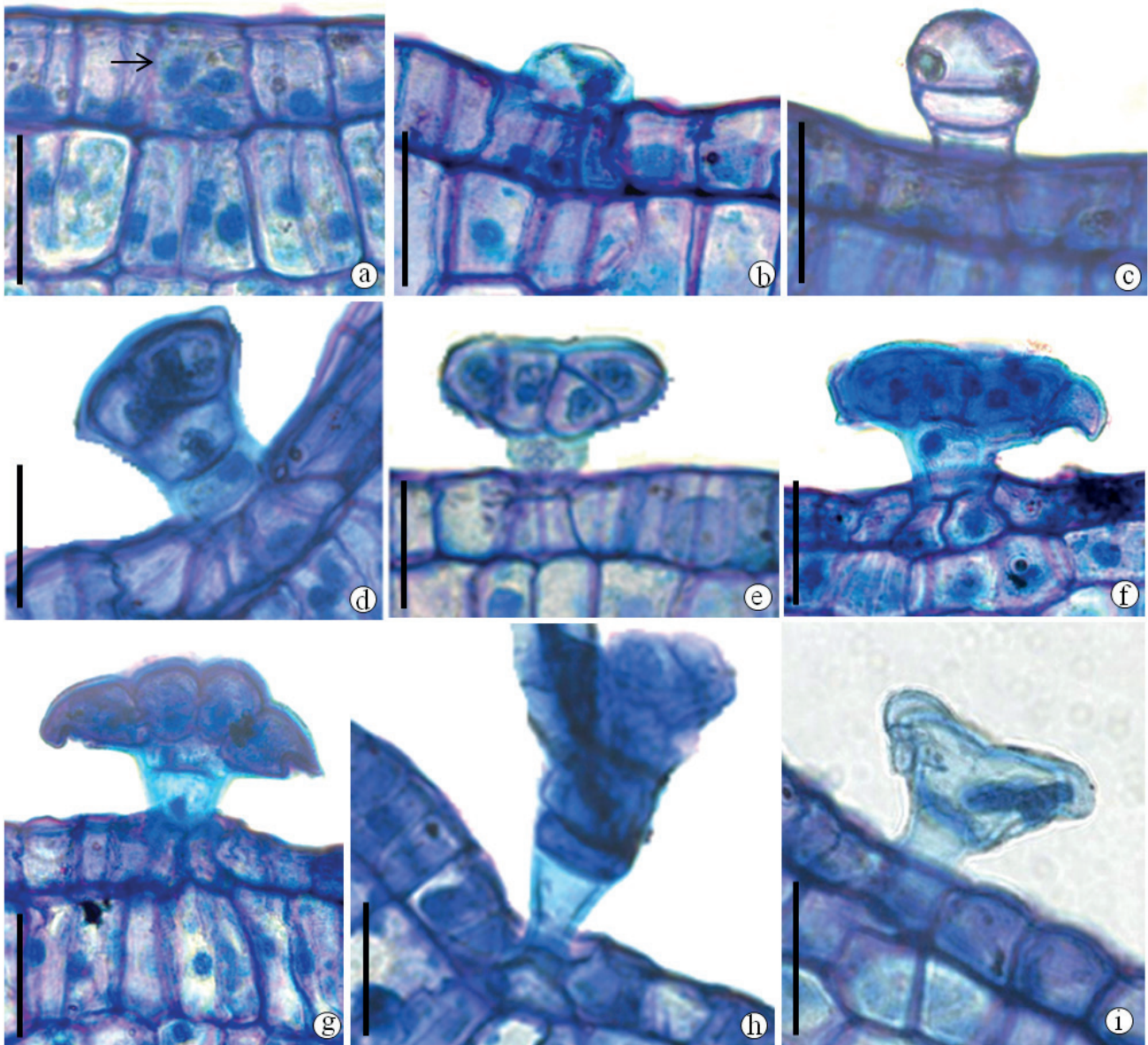


Figura 4. Ontogênese do tricoma glandular peltado em folhas jovens de *Esenbeckia febrifuga*, em corte transversal. (a) Células epidérmicas iniciais formando as células basais. (b) Formação de célula peduncular. (c) Formação da célula precursora da cabeça secretora. (d) Fase com duas células na cabeça. (e) Fase com quatro células na cabeça secretora. (f) Porção secretora com várias células. (g) Fase secretora com células de citoplasma denso. (h) Rompimento da cutícula liberando o conteúdo secretado. (i) Tricoma na fase pós-secretora em forma de cálice. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

Figure 4. Ontogenesis of the peltate glandular trichome in young leaves of *Esenbeckia febrifuga*, in cross-section. (a) Early epidermal cells forming the basal cells. (b) Peduncle cell formation. (c) Formation of the precursor cell of the secretory head. (d) Two-celled phase in the head. (e) Four-celled phase in the secretory head. (f) Secretory portion with multiple cells. (g) Secretory phase with cells of dense cytoplasm. (h) Breaking of the cuticle releasing the secreting content. (i) Trichome in the post-secretory phase with a calyx-form. Bars = 10  $\mu\text{m}$ .

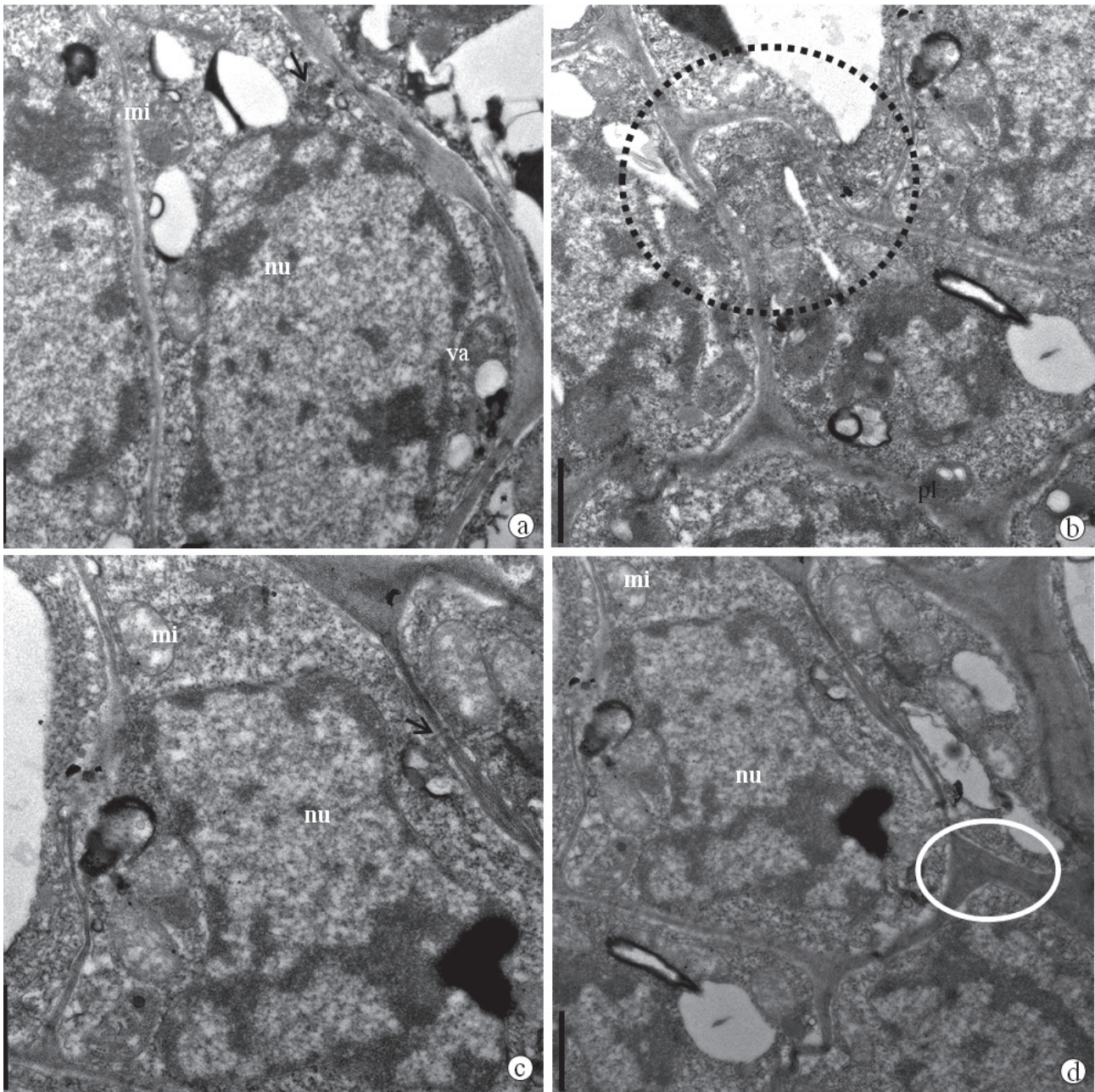


Figura 5. Ultraestrutura das células iniciais das cavidades secretoras em *Esenbeckia febrifuga*. (a) Célula inicial recém-dividida com núcleo grande, vacúolos pequenos, mitocôndrias e polirribossomos (seta). (b) Aglomerado de células iniciais evidenciando o crescimento intrusivo (linha pontilhada) e a presença de plastídio com grão de amido. (c) Presença de plasmodesmas (seta) indicando comunicação entre as células iniciais. (d) Indício do início de afastamento da lamela média para a formação do lúmen (linha cheia). nu = núcleo, mi = mitocôndria, pl = plastídio, va = vacúolo. Barras = 1  $\mu$ m.

Figure 5. Ultrastructure of the initial cells of the secretory cavities in *Esenbeckia febrifuga*. (a) A newly divided initial cell with a large nucleus, small vacuoles, mitochondria and polyribosomes (arrow). (b) Agglomerate of initial cells showing intrusive growth (dot line) and the presence of a plastid with starch grain. (c) Presence of plasmodesmata (arrow) indicating communication between initial cells. (d) An indication of the beginning of the removal of the medial lamella for lumen formation (full line). nu = nucleus, mi = mitochondria, pl = plastid, va = vacuole. Bars = 1  $\mu$ m.

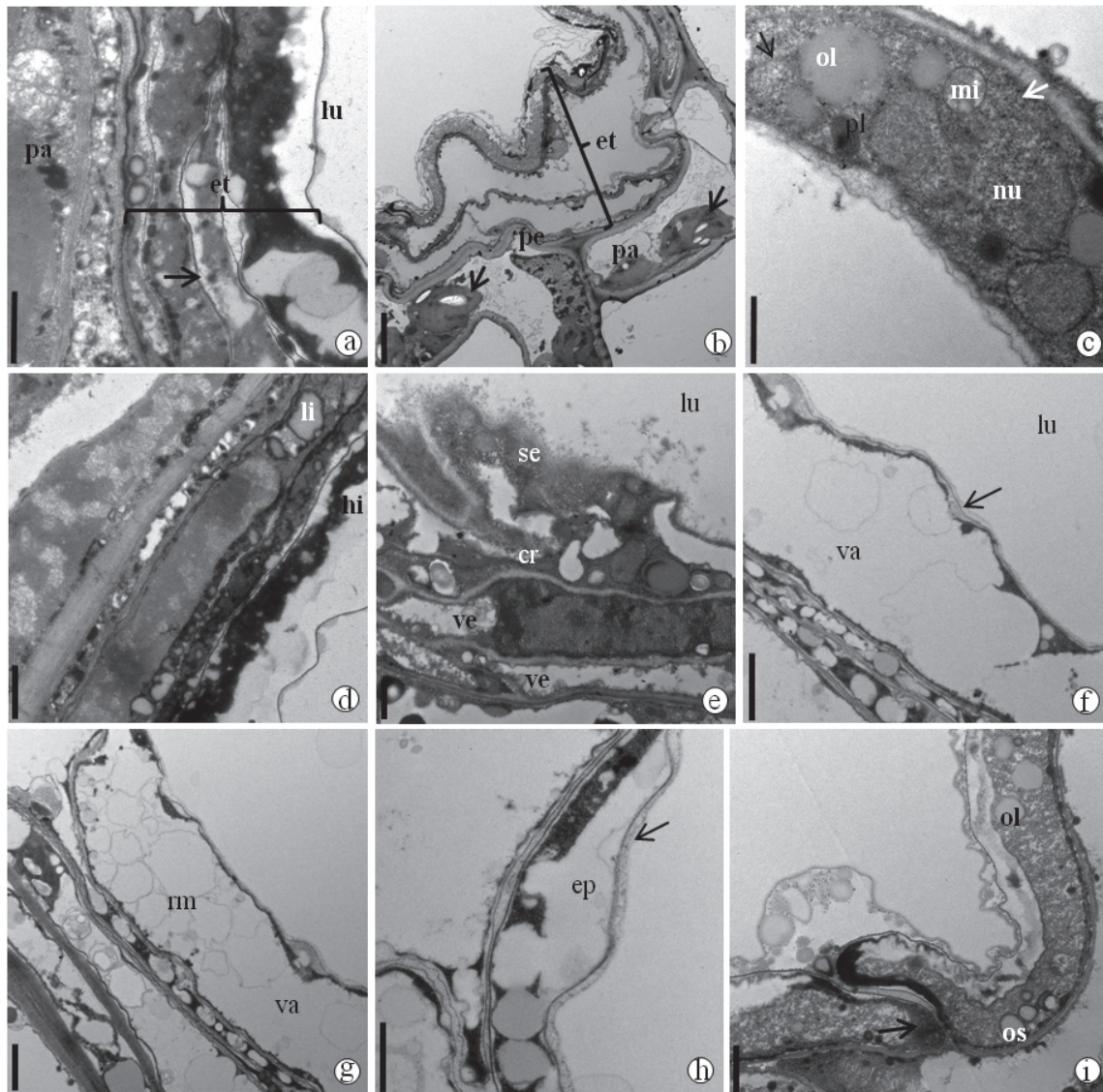


Figura 6. Ultraestrutura do estágio secretor das cavidades. (a, b, d, i) *Esenbeckia grandiflora*. (c, e-h) *Esenbeckia febrifuga*. (a) Epitélio multisseriado com células de parede afilada (seta). (b) Células adjacentes ao epitélio com parede espessada e amiloplastos com grãos de amido (setas). (c) Célula epitelial com núcleo grande, plastídios sem grana estruturada, mitocôndrias, retículos endoplasmáticos rugosos (setas) e gotas de óleo no protoplasto. (d) Conteúdo celular misto, hidrofílico e lipofílico. (e) Evidência do caminho da secreção em direção ao lúmen, observando-se inúmeras vesículas e uma célula rompida liberando a secreção. (f) Indício de secreção écrina em direção ao lúmen (seta). (g) Restos membranosos de organelas lisadas dentro do vacúolo. (h) Aumento do espaço periplasmático e presença de miofibrilas juntamente com o conteúdo secretado (seta). (i) Material osmiofílico e corpos de óleo, citoplasma com acúmulo de vesículas elétron-densas na extremidade da célula (seta). pa = parênquima, et = epitélio, lu = lúmen, pe = parede espessada, mi = mitocôndria, pl = plastídio, nu = núcleo, ol = corpos de óleo, li = material lipofílico, hi = material hidrofílico, se = secreção, cr = célula rompida, ve = vesícula, va = vacúolo, rm = restos membranosos, ep = espaço periplasmático, os = material osmiofílico. Barras = (a, c, d, e, h, i) 1  $\mu$ m; (b) 5  $\mu$ m; (f, g) 2  $\mu$ m.

Figure 6. Ultrastructure of the cavities secretory stage. (a, b, d, i) *Esenbeckia grandiflora*. (c, e-h) *Esenbeckia febrifuga*. (a) Multiseriate epithelium with sharp-edged cell walls (arrow). (b) Thick-walled cells adjacent to the epithelium and amyloplasts with starch grains (arrows). (c) Epithelial cell with a large nucleus, plastids without structured granum, mitochondria, rough endoplasmic reticles (arrows), and oil droplets in the protoplast. (d) Mixed hydrophilic and lipophilic cellular content. (e) Evidence of secretion pathway towards the lumen, showing a great number of vesicles and a ruptured cell releasing the secretion. (f) An indication of eccrine secretion towards the lumen (arrow). (g) Membranous remains of lysed organelles within the vacuole. (h) Increased periplasmic space and presence of myofibrils with the secreted content (arrow). (i) Osmiophilic material and oil bodies, cytoplasm with an accumulation of electron-dense vesicles at the cell end (arrow). pa = parenchyma, et = epithelium, lu = lumen, pe = thickened wall, m = mitochondria, pl = plastid, nu = nucleus, ol = oil bodies, h = hydrophilic material, s = secretion, cr = ruptured cell, ve = vesicle, va = vacuole, rm = membranous remains, ep = periplasmic space, os = osmiophilic material. Bars = (a, c, d, e, h, i) 1  $\mu$ m; (b) 5  $\mu$ m; (f, g) 2  $\mu$ m.

## Discussão

Distribuição, morfologia e histoquímica das estruturas secretoras - Além das distintas cavidades secretoras de Rutaceae, nesse trabalho, observou-se em *Esenbeckia febrifuga* e *Esenbeckia grandiflora* a presença de tricomas glandulares multisseriados e grande quantidade de células contendo cristais de oxalato de cálcio, além de outros tipos de idioblastos, corroborando com os dados de Metcalfe & Chalk (1950), que citam a presença dessas e outras estruturas secretoras internas e externas ocorrentes na família. Segundo Fahn (1988b), todos os tipos de tecidos secretores são comuns em eudicotiledôneas, incluindo tricomas glandulares.

Nas espécies analisadas as cavidades possuem epitélio multisseriado, assim como em *Zanthoxylum rhoifolium* L. (Krause 2013) e *Metrodorea nigra* A. St.-Hill. (Machado *et al.* 2017). Diferentemente dessas, há cavidades secretoras cujo epitélio é circundado por várias camadas de células e por uma bainha, que no processo de expansão da cavidade se incorpora tardiamente ao epitélio. A parede da camada mais externa de células da bainha geralmente é espessa (Fahn 1988b). Essas últimas características foram observadas em várias outras rutáceas (Liu & Hu 1998) e em fabáceas (Rodrigues *et al.* 2011a, Rodrigues & Machado 2012). Esse fato indica que, em relação à estrutura das cavidades secretoras, não há unanimidade ou exclusividade em Rutaceae e que grupos próximos filogeneticamente podem ter estruturas semelhantes.

As cavidades secretoras das espécies estudadas são sempre localizadas próximas à epiderme e possuem conteúdo lipofílico, o que também foi observado em espécies de *Citrus* L. (Lopes *et al.* 2013, Oliveira *et al.* 2014).

Segundo Machado & Rodrigues (2013b), as substâncias secretadas pelas glândulas (cavidades) de óleo, são sintetizadas pelas próprias células que as constituem.

Nas folhas de *E. febrifuga* e *E. grandiflora*, as cavidades ocorrem apenas no mesofilo. Liu & Hu (1998) descreveram as cavidades secretoras das folhas de 40 espécies, dentre 22 gêneros de Rutaceae ocorrentes na China e concluíram que a localização e a estrutura das cavidades eram correlatas em gênero e espécie.

Observou-se pouca variação anatômica entre as cavidades secretoras de *E. grandiflora* e *E. febrifuga*. Isso se deve ao fato dessa estrutura ser mais primitiva,

pois, segundo Fahn (1988b) as estruturas secretoras internas se desenvolveram evolutivamente por primeiro, partindo de idioblastos, depois as cavidades e por último, mais recentemente, evoluíram os tricomas glandulares. Logo, supõe-se que as estruturas secretoras mais primitivas tenham pouca variação entre grupos taxonômicos próximos.

Além das cavidades comuns às rutáceas, dados de Kaastra (1982) referem-se à presença de tricomas glandulares em *Esenbeckia*. Esse tipo de estrutura secretora é característica distintiva de muitas espécies vegetais e se desenvolvem sem estímulo externo, ao contrário das cavidades, que se desenvolvem com ou sem estímulo (Fahn 1988b). Desse modo, o estudo de tricomas secretores possui grande valor taxonômico.

Foram observados dois tipos de tricomas glandulares multicelulares: capitado em *E. grandiflora* e peltado em *E. febrifuga*. Muntoreanu *et al.* (2011) observaram a presença de tricomas peltados nas folhas de espécies de *Pilocarpus* Vahl, *Metrodorea* A. St.-Hill., *Helietta* Tul. e *Raulinoa* R. S. Cowan; além de tricomas capitados em *Esenbeckia leiocarpa* Engl., que ocorrem em depressões epidérmicas e possuem pedúnculo e cabeça multisseriados. Comprova-se assim, que não há um padrão morfológico de tricomas glandulares para o gênero analisado neste estudo.

Nos tricomas peltados e capitados analisados ocorre o espessamento das paredes laterais das células pedunculares. Esse espessamento, por meio de completa cutinização, é uma característica comum a todos os tricomas glandulares e evita que a secreção retorne ao interior da planta por via apoplástica, sendo esse efeito comparado ao da endoderme radicular (Ascensão 2006, Machado & Rodrigues 2013a).

A origem protodérmica e o tipo de desenvolvimento dos tricomas glandulares de *E. febrifuga* é comum aos tricomas em geral e, todas as etapas de desenvolvimento, como foram observadas nesse estudo, foram descritas por Ascensão (2006).

O tricoma encontrado em forma de cálice, com a cutícula rompida, indica a fase pós-secretora. Devido a fatores ambientais e forças físicas, toda a estrutura dos tricomas pode se desprender da epiderme e restar apenas sua impressão na superfície epidérmica.

Os testes histoquímicos registraram grande quantidade e ampla distribuição de alcaloides em ambas as espécies, o que é comum em Rutaceae. Waterman (1975) e Silva *et al.* (1988) chegaram a sugerir uma filogenia e sistemática para a família baseadas na distribuição dos diferentes alcaloides ao longo dos táxons subordinados.

Os idioblastos oleíferos de *E. febrifuga* e *E. grandiflora* não possuem diferenças significativas das células comuns. Outros estudos desse tipo de idioblasto registraram a presença de uma cúpula em formato de sino que liga a cavidade de óleo à parede celular, bem como a suberização da parede (Silva 1997; Machado & Rodrigues 2013b), o que não foi observado no presente estudo.

Os cristais de oxalato de cálcio encontrados em grande quantidade nas duas espécies analisadas são os mais comuns ocorrentes nas plantas (Fahn 1974) e ocorrem em grande quantidade em Rutaceae (Metcalfe & Chalk 1950), como foi relatado em *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Krause 2013), *Citrus limettioides* Tanaka (Lopes *et al.* 2013), *Esenbeckia leiocarpa* (Muntoreanu *et al.* 2011) e espécies de *Pilocarpus* (Kaastra 1982, Spegazzini *et al.* 2002).

A presença de fenóis também foi observada no limbo de ambas as espécies e nas cavidades secretoras do caule de *E. grandiflora*, assim como nas folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* (Krause 2013).

De forma geral, o fato das estruturas secretoras terem sido observadas em maior quantidade nos órgãos mais jovens sugere que possuem função de proteção dos meristemas contra herbivoria. O tipo de compostos secretados/armazenados, principalmente pelos idioblastos, como alcaloides e cristais de oxalato de cálcio, reforça essa ideia, pois são substâncias pouco palatáveis.

**Ontogênese das estruturas secretoras** - No processo de diferenciação das cavidades, o aumento do volume citoplasmático e nuclear das células iniciais, observados em ambas as espécies estudadas, indica uma provável atividade intensa, gerada para promover as divisões celulares. Em seguida, foi observado o aparecimento de espaços intercelulares, por meio do afastamento das células centrais no início da formação do lúmen, ao qual se denomina esquizogênese, completando a formação do lúmen e chegando ao fim da fase denominada pré-secretora.

A cavidade, observada com epitélio multisseriado, encontra-se no estágio secretor, no qual sua atividade é máxima. Já as cavidades evidenciadas com ausência de atividade secretora, de renovação celular epitelial e de restos celulares no lume das cavidades, indicam que entraram em senescência, ou seja, no estágio pós-secretor.

As cavidades secretoras analisadas possuem origem subepidérmica, assim como Bennici & Tani (2004) observaram em espécies de *Citrus*, que por vezes também podem ter origem diretamente epidérmica.

Importantes características das cavidades secretoras de óleo presentes em *Esenbeckia febrifuga* e *E. grandiflora* também foram observadas em *Metrodorea nigra* (Machado *et al.* 2017), como: a origem da cavidade proveniente de células abaixo da protoderme; a formação esquizolisígena das cavidades; presença de epitélio multisseriado com células achatadas de paredes muito delgadas, que se desintegram e são repostas continuamente. Esse fato sugere que essas três espécies podem ter proximidade filogenética. Há divergências apenas em relação ao início da produção de óleo que, em *M. nigra*, se dá antes da formação do lúmen; e, em relação à origem das células que repõe o epitélio, que advém das células ao redor da cavidade em *M. nigra*.

As células epiteliais achatadas de paredes delgadas encontradas em *E. febrifuga*, *E. grandiflora* e, também em *Metrodorea nigra* (Machado *et al.* 2017), segundo Liu & Hu (1998), são evidências do desenvolvimento esquizógeno das cavidades.

O inchaço observado pelo aumento do volume das células centrais do aglomerado precursor das cavidades de *E. febrifuga* e *E. grandiflora*, segundo Turner *et al.* (1998), é resultado de artefatos da fixação primária aquosa que dá uma falsa impressão de senescência precoce, sugerindo ocorrência de lisigenia. Ignorando essa informação, Aeri (2007) nomeia como lisígenas as cavidades secretoras de óleos essenciais presentes em Rutaceae.

**Ultraestrutura e processo secretor das cavidades** - Como relatado, a formação ontogênica das cavidades analisadas é esquizógena, evidenciada, nesse trabalho, pelo afastamento da lamela média entre as células iniciais centrais observadas em análise ultraestrutural. Posteriormente, ao longo das sucessivas secreções, ocorre lisigenia no processo de ampliação do lúmen, sendo assim chamada de esquizolisígena. Esse fato também foi observado em outros gêneros de Rutaceae, como *Pilocarpus* (Spegazzini *et al.* 2002, Muntoreanu *et al.* 2011), *Metrodorea* (Machado *et al.* 2017) e *Citrus* (Bennici & Tani 2004). Este fenômeno não é exclusivo da família, ocorrendo também em Fabaceae (Rodrigues *et al.* 2011a, b). Juntamente com a discussão sobre lisigenia no desenvolvimento das cavidades secretoras, há a sugestão de morte celular programada (MCP), relatada no estudo das folhas da rutácea *Dictamnus dasycarpus* Turcz (Zhou *et al.* 2014) e da fabácea *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (Rodrigues *et al.* 2011a). Seriam necessários estudos mais aprofundados para se comprovar ou refutar essa hipótese para *E. febrifuga* e *E. grandiflora*.

Grande quantidade de mitocôndrias, a presença de amido de assimilação, vacúolos pequenos e núcleo grande presentes no citoplasma das células iniciais das cavidades, indica uma intensa atividade celular, ou seja, a cavidade se encontra em plena fase secretora. Além disso, ocorrem plasmodesmas nas paredes tangenciais das células comuns evidenciando que há comunicação entre as células precursoras da cavidade e o tecido parenquimático adjacente.

As células epiteliais mais internas que apresentaram um contorno irregular, vacúolo grande e mitocôndrias com poucas cristas, somam características que indicam atividade celular reduzida, ou seja, indica que a estrutura está na fase pós-secretora (senescência).

Comprovando que as cavidades analisadas secretam material lipofílico, foram observadas muitas gotículas de óleo no citoplasma das células epiteliais. Supostamente, todos os compartimentos celulares participam da secreção desse tipo de material, sendo comum que os plastídios e o retículo endoplasmático (RE) tenham sua contribuição no processo de síntese (Fahn 1988a, Machado & Rodrigues 2013a).

Observou-se também que as cavidades possuem conteúdo celular misto: lipofílico e hidrofílico. Segundo Fahn (1988a), esse fato é comum, pois frequentemente o mesmo tecido secreta substâncias diferentes.

Há grande quantidade de material osmiofílico nos plastídios do epitélio das cavidades de *E. febrifuga* e *E. grandiflora* que, segundo Fahn (1988a), é a característica ultraestrutural mais comum das células que secretam substâncias lipofílicas.

Evidências do caminho da secreção, partindo das células epiteliais mais externas em direção ao lúmen, mostram que nas cavidades ocorrem todos os métodos de secreção possíveis: écrina, granulócina e holócina. Vesículas liberando o conteúdo por exocitose evidencia secreção do tipo granulócina. Os conteúdos transportados através da membrana plasmática indicam secreção écrina. A secreção resultante da autólise das células limitantes do lúmen é chamada de holócina.

Fahn (1988b) enfatiza que os mecanismos de secreção observados nos estudos ultraestruturais são similares em todos os tipos de tecidos secretores, incluindo idioblastos, tricomas glandulares, cavidades e ductos secretores.

Considerações finais - As estruturas secretoras observadas nas espécies estudadas (cavidades,

tricomas e idioblastos) foram registradas em outras espécies de Rutaceae e em outras famílias. O diferencial é a variação morfológica da cabeça dos tricomas glandulares de *E. febrifuga* e *E. grandiflora* que possuem uma simetria tetrâmera ainda não relatada para a família. Estudos mais amplos sobre os tipos de tricomas glandulares em Rutaceae podem auxiliar na filogenia de táxons próximos, como gênero e espécie.

O processo de secreção observado nas cavidades secretoras das espécies analisadas é comum para esse tipo de estrutura e sua localização e suas características anatômicas e ontogênicas se assemelham a de espécies de táxons próximos, como *Zanthoxylum rhoifolium* e *Metrodorea nigra*. Em especial, o tipo de formação esquizolisígena das cavidades secretoras é de grande valia para os estudos filogenéticos da família, mais especificamente de Pilocarpaceae.

### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada UEM, à Capes/DS pela concessão da bolsa de estudos; à equipe do COMCAP - UEM, pelo suporte técnico na microtomia e nas análises em MEV e à equipe do CME-IBB da UNESP de Botucatu- SP pelo suporte técnico no preparo das amostras e análise em MET, especialmente à Professora Dra. Tatiane Maria Rodrigues pelo auxílio na análise do material em MET.

### Literatura citada

- Aeri, V.** 2007. Pharmacognosy: Principles of Classification of Plants. New Delhi.
- Ascensão, L.** 2003. Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Ascensão, L.** 2006. Estruturas Secretoras em Plantas. Uma abordagem Morfo-anatômica. In: A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, & L.G. Pedro (ed.). Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, pp. 19-28.
- Bennici, A. & Tani, C.** 2004. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora 199: 464-475.
- Bigoniya, P. & Singh, K.** 2014. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. Revista Brasileira de Farmacognosia 24: 330-340.

- Bosabalidis, A. & Tsekos, I.** 1982. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. Early stages of gland cells differentiation. *Protoplasma* 112: 55-62.
- Botsaris, A.S.** 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. Disponível em <https://ethnobiomed.biomedcentral.com> (acesso em 20-V-2017).
- David, R. & Carde, J.P.** 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris, Série D*, 258: 1338-1340.
- Evert, R.F.** 2006. *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. Willey Interscience, New Jersey.
- Fahn, A.** 1974. *Anatomia Vegetal*. 2 ed. H. Blume Ediciones, Rosario.
- Fahn, A.** 1988a. Secretory Tissues and Factors Influencing their Development. *Phyton* 28: 13-26.
- Fahn, A.** 1988b. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108: 229-257.
- Furr, M. & Mahlberg, P.G.** 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.
- Gerlach, G.** 1969. *Botanische microtechnik eine einföhrung*. Georg. Thiem Verlag, Stuttgart.
- Guerrits, P.O.** 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology. Some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University, Netherlands.
- Jensen, W.A.** 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. WH Freeman, San Francisco.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevesn, P.F. & Donoghue, M.J.** 2009. *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Kaastra, R.C.** 1982. *Pilocarpinae (Rutaceae)*. *Flora Neotropica* 33: 1-197.
- Krause, M.S.** 2013. Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Lévi-strauss, C.** 1952. The use of wild plants in Tropical South America. *Economic Botany, The New York Botanical Garden* 6: 252-270.
- Liu, W.Z. & Hu, Z.H.** 1998. Comparative anatomy of secretory cavities in leaves of the Rutaceae in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica (Journal of Systematics and Evolution - 2008)* 36: 119-127.
- Lopes, L.T.A., Paula, J.R., Tresvenzol, L.M.F., Bara, M.T.F., Sá, S., Ferri, P.H. & Fiuza, T.S.** 2013. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettoides* Tanaka (Rutaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 34: 503-511.
- Machado, S.R. & Rodrigues, T.M.** 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27: 135-147.
- Machado, S.R. & Rodrigues, T.M.** 2013a. Capítulo Dezesseis: Estruturas Secretoras Externas. In: R.F. Evert (ed.). *Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento*, 3ed. Blucher, São Paulo, pp. 533-561.
- Machado, S.R. & Rodrigues, T.M.** 2013b. Capítulo Dezessete: Estruturas Secretoras Internas. In: R.F. Evert (ed.). *Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento*, 3 ed. Blucher, São Paulo, pp. 564-595.
- Machado, S.R., Canaveze, Y. & Rodrigues, T.M.** 2017. Structure and functioning of oil cavities in the shoot apex of *Metrodorea nigra* A. St.-Hil. (Rutaceae). *Protoplasma* 254: 1661-1674.
- Mello, C.B., Uzeda, C.D., Bernardino, M.V., Mendonça-Lopes, D., Kelecom, A., Fevereiro, P.C.A., Guerra, M.S., Oliveira, A.P., Rocha, L.M. & Gonzalez, M.S.** 2007. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 514-520.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L.** 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes in economic uses*, 1 ed. Oxford University Press, Ely House, London.
- Muntoreanu, T.G., Cruz, R.S.S.C., Pinna & G.F.A.M.** 2011. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. *Plant Systematics and Evolution*. Disponível em: <http://www.producao.usp.br> (acesso em 28-IV-2017).
- Novais, T.S., Costa, J.F.O., David, J.P.L., David, J.M., Queiroz, L.P., França, F., Giulietti, A.M., Soares, M.B.P. & Santos, R.R.** 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13: 5-8.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E.** 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Oliveira, A.B., Dolabela, M.F., Nascimento, J.M., Oliveira, S.G., Peres, J.M. & Pova, M.M.** 2008. In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology* 15: 367-369.

- Oliveira, D.M., Silva, I.V. & Rossi, A.A.B.** 2014. Estudo anatômico foliar de espécies de *Citrus* com potencial medicinal. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer de Goiânia 10: 3280-3290.
- Oliveira, P.E.S., Conserva, L.M., Brito, A.C. & Lemos, R.P.L.** 2005. Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical Biology* 43: 53-57.
- Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L. & Pathak, M.A.** 1974. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long wave ultraviolet light. *New England Journal of Medicine* 29: 1207-1211.
- Reynolds, E.S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Robbards, A.W.** 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp. 343-344.
- Rodrigues, T.M. & Machado, S.R.** 2012. Oil Glands in *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae): Distribution, Structure, and Secretion Mechanisms. *International Journal of Plant Sciences* 173: 984-992.
- Rodrigues, T.M., Santos, D.C. & Machado, S.R.** 2011a. The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae-Papilionoideae). *Comptes Rendus Biologies*. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acesso em 15-VII-2017).
- Rodrigues, T.M., Teixeira, S.P. & Machado, S.R.** 2011b. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* 206: 585-594.
- Silva, M.F.G.F., Gottlieb, O.R. & Ehrendorfer, F.** 1988. Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Systematics and Evolution* 161: 97-134.
- Silva, E.M.J.** 1997. Morfologia e ontogênese das estruturas secretoras em *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* – Piperaceae. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Spegazzini, E.D., Castro, M.T., Rossi, L., Carpano, S.M. & Nájera, T.N.** 2002. Micrografia foliar cuali-cuantitativa de três espécies de *Pilocarpus* (Rutaceae): *P. jaborandi* Holmes, *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth y *P. pennatifolius* Lem. *Dominguesia* 18: 5-16.
- Turner, G.W., Berry, A.M. & Gifford, E.M.** 1998. Schizogenous Secretory Cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and A Reevaluation of the Lysigenous Gland Concept. *International Journal of Plant Sciences*. Disponível em <http://www.journals.uchicago.edu> (acesso em 17-VII-2017).
- Waterman, P.G.** 1975. Alkaloids of the Rutaceae: their Distribution and Systematic Significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 3: 149-180.
- Zhou, Y.F., Mao, S.L., Lia, S.F., Nib, X.L., Lia, B. & Liub, W.Z.** 2014. Programmed cell death: A mechanism for the lysigenous formation of secretory cavities in leaves of *Dictamnus dasycarpus*. *Plant Science* 225: 147-160.