



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS



RÍSIA CEAN SILVA DE LIMA SANTOS

ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ARQUITETURA FOLIAR DE
***Chrysophyllum rufum* Mart. (SAPOTACEAE) OCORRENTE NO SEMIÁRIDO**
BAIANO

Feira de Santana - BA

2019

RÍSIA CEAN SILVA DE LIMA SANTOS

**ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ARQUITETURA FOLIAR DE
Chrysophyllum rufum Mart. (SAPOTACEAE) OCORRENTE NO SEMIÁRIDO
BAIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Elena Carneiro

Feira de Santana - BA

2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

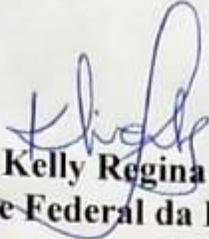
R238a Santos, Rísia Cean Silva de Lima
Anatomia, histoquímica e arquitetura foliar de *Chrysophyllum rufum*
Mart. (sapotaceae) ocorrente no semiárido baiano / Rísia Cean Silva de
Lima Santos . - 2019.
53 f.: il.

Orientadora: Cláudia Elena Carneiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2019.

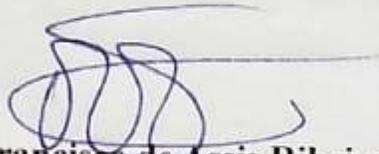
1. *Chrysophyllum rufum*. 2. Folha - Morfologia. I. Carneiro, Cláudia
Elena, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.92

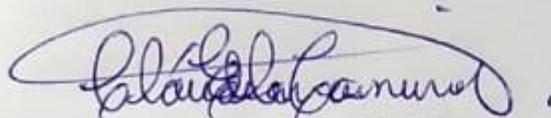
BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Kelly Regina Batista Leite
(Universidade Federal da Bahia - UFBA)**



**Prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)**



**Profa. Dra. Claudia Elena Carneiro
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca**

AGRADECIMENTOS

É hora de agradecer e esse trabalho não teria sido realizado se não fosse pelo apoio e incentivo de muitas pessoas. Primeiro a Deus, por tudo que tenho e sou. A mim, por ter acreditado que eu conseguiria e ter feito o melhor que pude, dizendo a mim mesma que eu sempre posso mais.

A Cláudia, porque resumir você só a minha orientadora é pouco, você se tornou uma pessoa importante e eu levarei por toda vida. Saiba que sou muito grata por tudo que você representa na minha vida acadêmica, por todos os puxões de orelha, ensinamentos, conversas, conselhos e principalmente pelos bons momentos compartilhados, que foram muitos. Sei que não é fácil, mas tu unes as forças e luta junto. Tu não tens noção do tanto que aprendi contigo, e eu não poderia ter escolhido pessoa melhor para me acompanhar durante esses anos no ingresso a pesquisa. Você é muito especial!

A meus pais, Elízia e Washington, que me ensinaram o valor do aprendizado, e que muito deste nunca é demais. Agradeço o apoio, estímulo e a força em todos os momentos, por toda a base de respeito, amizade e amor que nós criamos e cultivamos, isso tudo conta. Vocês são a melhor parte de mim.

Aos meus irmãos – Rian, Mathias e Rafael – por entenderem todas as ausências, por sempre perguntar como estava (e quando acabava rsrs) e por todo amor. E a Ylla, a minha amarela, que se mostrou uma pessoa incrível, não só por me dar todo apoio na reta final, mas por me incentivar sempre. Obrigada por todas as crises de riso nos momentos de desespero. Eu amo muito todos vocês!

Aos Lamivian@s, a família que eu tive a oportunidade de conhecer e construir nesses quase sete anos. Vocês fizeram muita coisa se tornar mais fácil. Cada um com seu jeitinho trouxe um pouco de alegria, sabedoria, experiências, conselhos e muito café. Obrigada!

A Andreza, por todo apoio, amizade, preocupação e companheirismo, por tudo que você é e representa para mim. Obrigada, amo tu! A Aninha, por ser tu... por me apoiar, aconselhar, ensinar e comemorar as minhas conquistas como se fossem suas. Tu és minha irmã, que vem de outras vidas. Eu te amo grandão!

A Elisama, desde a graduação, estágio, TCC, formatura... e olha aí, a gente venceu mais essa, juntas. Monick, por todo apoio tecnológico rsrs, pela companhia nas viagens de campo, por dividir tristezas e alegrias. A Débora por ter aparecido nesse caminho e ter compartilhado comigo suas vivências e ditados rs, tu és uma linda.

A Karine, Mahysa e Kika meu muito obrigada pelos momentos bons e alegrias que acrescentam à vida. Obrigada pela amizade constante e sincera. A Vânia eu agradeço por tudo, por ser assim e por estar aqui, e ter vivido comigo todas essas experiências acadêmicas. Eu amo.

Aos amigos e colegas que foram presentes (mesmo quando longe) e se tornaram importantes durante esse processo; por me entenderem e apoiarem, e por estarem sempre me lembrando que acreditavam e torciam por mim. Em especial a Bah, Gabi, João Neto, Kelly, Iasmin, Paulo Vagner Vivi, Polly, Flavinha, Jamile, aos colegas de mestrado Cris e Romeu. Dentre tantos outros que não citei porque não caberia e certamente esqueci alguém, mas que não deixam de ser importantes. Vocês fazem parte disso tudo!

Aos meus familiares que sempre me incentivaram, que trouxeram conforto em vários momentos e, que me entendem e torcem por mim, principalmente aqueles que sempre perguntavam e mostravam se importar, minha comadre Vanessa, Danny, Mércia, Gabi, Tina, Vó Pide, Fabi, Tia Irene, minha dinda Nelza, Rafaela (Ninha) e em especial ao meu afilhado/filhote Enzo: dinda ama você. Vocês tornaram tudo isso um pouco mais fácil. Gratidão!

A Universidade Estadual de Feira de Santana pela estrutura e experiências, ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de concluir essa etapa, acrescentando conhecimento científico e pessoal, a FAPESB pela bolsa concedida possibilitando viagens de campo e coleta. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse concluir mais essa etapa na minha vida. Todos têm sua parcela de importância e eu serei grata, sempre.

“... E que eu sei o tempo certo da vitória te entregar; este tempo é necessário pra te amadurecer.” (Eu cuido de ti - Amanda Wanessa)

*“Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os
teus caminhos.”*

Salmos 91:11

RESUMO

SANTOS, R. C. S. L. 2019. **Anatomia, histoquímica e arquitetura foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. (Sapotaceae) ocorrente no semiárido baiano.** 57 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, 2019.

Sapotaceae é uma família de árvores e arbustos pantropicais, com grande diversidade na América do Sul, se destacando economicamente na alimentação, na medicina popular e na indústria madeireira. De acordo com a classificação mais recente, a família é subdividida em três subfamílias, Sarcospermatoideae, Sapotoideae e Chrysophylloideae, sendo esta última composta por 25 gêneros. *Chrysophyllum* L. é o segundo maior gênero de Chrysophylloideae, com 81 espécies neotropicais. No Brasil está representado por 31 espécies ocorrendo nas diversas formações vegetais, das quais 14 espécies são endêmicas. Dentre as espécies endêmicas, *Chrysophyllum rufum* Mart. ocorre em formações florestais do semiárido baiano, sendo representado por indivíduos que podem atingir até 20m de altura, caracterizados pelo indumento ferrugíneo na face abaxial das folhas e nas sépalas, e flores pequenas esverdeadas. Devido a carência de estudos morfoanatômicos para a família, objetivou-se caracterizar as folhas de *Chrysophyllum rufum* através de estudos anatômicos, histoquímicos e da arquitetura foliar, a fim de contribuir para a correta identificação da espécie e a obtenção de subsídios para estudos mais específicos. O estudo foi realizado com folhas adultas coletadas em municípios inseridos no semiárido baiano. Seções transversais do pecíolo e da lâmina foliar foram obtidas através de cortes a mão livre, e tratados de acordo com a bibliografia específica. Os testes histoquímicos detectaram amido, lignina, compostos fenólicos, açúcares redutores, cristais de oxalato de cálcio, mucopolissacarídeos, pectinas e mucilagens. Nas análises anatômicas, foi possível verificar o formato do pecíolo, presença de tricomas malpighiáceos, tipos de estômatos, mesofilo dorsiventral, cristais de oxalato de cálcio e laticíferos. O padrão de venação foi avaliado após diafanização, sendo constante em todas as amostras e compatível com o descrito para a família. Os estudos realizados visam fornecer elementos suficientes para subsidiar outras pesquisas.

Palavras-chave: Chrysophylloideae. Folha. Morfologia. Compostos secundários. Venação.

ABSTRACT

SANTOS, R. C. S. L. 2019. **Anatomy, histochemistry and leaf architecture of *Chrysophyllum rufum* Mart. (Sapotaceae) in the Bahia semiarid region.** 57 p. Master's thesis (Master in Plant Genetic Resources) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, 2019.

Sapotaceae is a family of pantropical trees and shrubs, with great diversity in South America, being economically prominent in food, folk medicine and the timber industry. According to the most recent classification, the family is subdivided into three subfamilies, Sarcospermatoidae, Sapotoideae and Chrysophylloideae, the latter being composed of 25 genera. *Chrysophyllum* L. is the second largest genus of Chrysophylloideae, with 81 neotropical species. In Brazil it is represented by 31 species occurring in the various plant formations, of which 14 species are endemic. Among the endemic species, *Chrysophyllum rufum* Mart. occurs in forest formations of the Bahian semi - arid, being represented by individuals that can reach up to 20m in height, characterized by the rusty dress on the abaxial face of the leaves and sepals, and small greenish flowers. Due to the lack of morpho-anatomical studies for the family, the objective was to characterize the leaves of *Chrysophyllum rufum* through anatomical, histochemical and foliar architecture studies, in order to contribute to the correct identification of the species and the obtaining of subsidies for more specific studies. The study was carried out with adult leaves collected in municipalities inserted in the Bahian semi - arid region. Cross sections of the petiole and leaf blade were obtained through free hand cuts and treated according to the specific bibliography. Histochemical tests detected starch, lignin, phenolic compounds, reducing sugars, calcium oxalate crystals, mucopolysaccharides, pectins and mucilages. In the anatomical analyzes, it was possible to verify the shape of the petiole, presence of malpigiaceous trichomes, types of stomata, dorsiventral mesophyll, calcium oxalate crystals and laticifers. The venation pattern was evaluated after diaphanization, being constant in all samples and compatible with that described for the family. The studies carried out aim to provide sufficient elements to support other research.

Key words: Chrysophylloideae. Leaf. Morphology. Secondary compounds. Venation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Superfície foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. em vista frontal sob microscópio óptico. A-B Epiderme adaxial, mostrando células epidérmicas (ce) de paredes mais sinuosas, cicatrizes de tricomas (ct) e células costais (cc). C-D: Epiderme da face abaxial mostrando células da nervura (cn), células intercostais (ci), estômatos (es) do tipo anisocítico e cicatrizes de tricomas (ct). Barra: Figs A-D = 50 μm 43

Figura 2- Eletromicrografias de varredura de *Chrysophyllum rufum* Mart. em vista frontal. A-B. Superfície adaxial apresenta grande quantidade de deposição de cera (ce) e ornamentações em forma de estrias (est). C-D. Superfície abaxial mostrando estômatos (es), ornamentações estriadas (est) e tricoma (tr) do tipo malpiguáceo. Barra: Fig A= 200 μm ; B=5 μm ; Fig C= 10 μm ; Fig D= 100 μm 44

Figura 3- Seções transversais da folha de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Pecíolo com o sistema vascular em arco fechado (svf), idioblastos (id) e laticíferos (lat). B. Detalhe da região central do pecíolo, com feixe vascular aberto (fva), floema externo (fl) e xilema interno (xl). C. Região da nervura principal da lâmina foliar mostrando cinturão de células de esclerênquima (escl) ao redor do feixe vascular (fv), células de colênquima (col) abaixo da epiderme. D. Região do mesofilo mostrando feixe vascular (fv) imerso nos parênquimas paliçádico (pp) e esponjoso (pe), destaque em quadrado vermelho para a câmara subestomática. E-F. Mesofilo dorsiventral, mostrando cutícula pouco espessa (cut), camada uniestratificada de células epidérmicas (ce), parênquima paliçádico (pp) e parênquima esponjoso (pe), tricomas (tr) malphiguiáceos na face abaxial. G. Bordo foliar fletido, com tricomas na face abaxial (tr). H. Extremidade do bordo foliar mostrando flanges na cutícula (fcut), células do parênquima paliçádico arredondadas (ppa). Barra: Fig A= 500 μm ; Figs B,C, E, G = 200 μm ; Figs D, F, H = 50 μm 45

Figura 4- Reações histoquímicas em pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Cloreto férrico 10%. B. Dicromato de potássio. C. Cloreto de zinco. D. Etanol 100%. E. Fehling. F. Azul de alcian. Barra = 500 μm 46

Figura 5- Reações histoquímicas em pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Sudan III. B. Floroglucina acidificada. C. Lugol. D. Sudan IV. E. Vermelho de rutênio 0,2%. F. Destaque para mucilagem corada em seção transversal do pecíolo. Barra = 500 μm47

Figura 6– Reações histoquímicas na região mediana da lâmina foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Cloreto de zinco. B. Região do mesofilo em reação ao Cloreto de zinco. C. Dicromato de potássio. D. Fehling. E. Cloreto férrico 10%. F. Azul de alcian. Barra = 200 µm..48

Figura 7- Reações histoquímicas na região mediana da lâmina foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Sudan III. B. Região do mesofilo mostrando a reação do Sudan III na cutícula. C. Etanol 100%. D. Sudan IV. E. Lugol, depósito de amido no parênquima paliçádico. F. Lugol, presença de amido no mesofilo. G. Floroglucina. H. Vermelho de rutênio 0,2%. Barra = 200 µm.....49

Figura 8- Folhas de *Chrysophyllum rufum* Mart. A-B. Superfície adaxial mostrando o ramo e as inflorescências e a folha inteira de cor verde. C-D. Superfície abaxial mostrando o ramo com flores e inflorescência e a folha inteira, destacando a coloração ferrugínea consequente da grande quantidade de tricomas. Barra = 2 cm..... 50

Figura 9 - Folhas diafanizadas de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Folha simples, camptódroma do tipo broquidódroma, com a nervura primária (np) de orientação reta. B. Ápice foliar mostrando nervuras de menor calibre próximas a extremidade. C-D. Venação secundária broquidódroma, com nervuras marginais (nm) e intersecundárias (is). E-G. Detalhe do terço médio da folha mostrando nervuras terciárias (nt) formando aréolas (ar). H. Início da nervura primária na base da lâmina foliar (np). Barra = Fig F-G= 1mm; Figs A-E, H= 2mm. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação de compostos secundários no pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. por meio de testes histoquímicos..... 29

Tabela 2- Identificação de compostos secundários na região mediana da folha de *Chrysophyllum rufum* Mart. por meio de testes histoquímicos..... 30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Grupos de metabólitos, reagentes e autores das metodologias utilizadas nos testes histoquímicos

25

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	15
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
ANATOMIA	24
ARQUITETURA FOLIAR	25
HISTOQUÍMICA	25
RESULTADOS	27
ANATOMIA	27
HISTOQUÍMICA	29
ARQUITETURA FOLIAR	31
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	43

INTRODUÇÃO GERAL

O Semiárido brasileiro é composto por 1.262 municípios dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. Ocupa 12% do território nacional, considerando a delimitação atual divulgada na Resolução 115, de 23 de novembro de 2017, da SUDENE (É..., 2015). Os critérios para delimitação do Semiárido foram a precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 mm; o índice de Aridez de Thornthwaite igual ou inferior a 0,50° e o percentual diário de déficit hídrico igual ou superior a 60%, considerando todos os dias do ano (IBGE, 2018).

O estado da Bahia contém 278 municípios dentro do semiárido, de acordo a Resolução 115/2017, publicada pela SUDENE (É..., 2015). Do ponto de vista climático, a região semiárida é marcada por ciclos de estiagens prolongadas anualmente ou plurianualmente. Chove em média três meses no ano e, durante os outros nove, há pouca ou nenhuma precipitação. Compilações de estudos florísticos na região Nordeste apontam para cerca de 5.000 espécies vegetais distribuídas em pelo menos 150 famílias botânicas (PEREZ-MARIN *et al.*, 2013).

Sapotaceae é uma família de árvores e arbustos pantropicais de tamanho médio contendo cerca de 1.250 espécies, que vem aumentando constantemente (PENNINGTON, 1991; GOVAERTS *et al.*, 2001; ARMSTRONG, 2010). É uma família com predomínio em mata úmida de planície, com alguns gêneros bem representados em savanas e em zonas semiáridas (PENNINGTON, 1990). A família fornece produtos com importância econômica como o látex para gutta percha e goma de mascar, madeira valiosa, e muitas frutas comestíveis. Dentre seus principais gêneros, destacam-se *Pouteria* Aubl. e *Chrysophyllum* L., com aproximadamente 330 e 81 espécies, respectivamente, distribuídas em sua grande maioria nos Neotrópicos (PENNINGTON 1991; SWENSON & ANDERBERG, 2005). No Brasil, as espécies de Sapotaceae se apresentam como árvores de médio a grande porte ou arbustos, latescentes, polinizadas por insetos e pássaros – algumas espécies com antese noturna são polinizadas por morcegos e mariposas (BAWA, 1990; PENNINGTON, 1990), e dispersadas por pássaros, macacos, morcegos, marsupiais, peixes e pequenos roedores (PENNINGTON, 1990).

Chrysophyllum L. é o segundo maior gênero de Sapotaceae com 81 espécies distribuídas em sua maioria na região neotropical. Pertence a subfamília Chrysophylloideae, que é o maior agrupamento dentro da família, composto por 25 gêneros e 660 espécies aproximadamente (LIMA, 2016). Para o Brasil, são documentadas 31 espécies de *Chrysophyllum* L. (com 9 subespécies e 14 espécies endêmicas), apresentando ampla distribuição (Centro-Oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul) e registros para os diferentes domínios fitogeográficos (Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica e Floresta Atlântica). O gênero está representado no estado da Bahia por 12 espécies, ocorrendo em biomas como o cerrado, a caatinga e fragmentos de mata imersos nestes ambientes (CARNEIRO *et al.*, 2015). O gênero foi proposto por Lineu (1753) na obra “*Species Plantarum*”, e sua descrição foi baseada em *Chrysophyllum cainito* L., sendo caracterizado por folhas alternas, pecioladas, ovadas, face adaxial glabra e abaxial tomentosa, fruto arredondado, liso, arroxeadado quando maduro (LIMA, 2016).

Chrysophyllum rufum Mart. é uma espécie arbustiva ou de árvores de pequeno porte que podem alcançar até 20 metros de altura, caracterizada pelo indumento dourado-ferrugíneo na face abaxial das folhas, com flores pequenas medindo de 2 a 3 mm, sépalas esverdeadas com tricomas ferrugíneos e pétalas delicadas branco-esverdeadas (LIMA *et al.*, 2017).

O estudo taxonômico mais recente para a família Sapotaceae é o trabalho de Swenson e Anderberg (2005) que com base em dados moleculares sugere uma divisão infrafamiliar, esclarecendo relações filogenéticas entre os gêneros. Faria *et al.* (2017) realizaram um estudo para investigar as relações filogenéticas das Chrysophylloideae Neotropicais baseados em dados moleculares, no qual propõem uma hipótese filogenética para Chrysophylloideae Neotropical confirmando o polifiletismo de *Chrysophyllum* e *Pouteria*.

Na literatura existem trabalhos para a família que abordam como tema principalmente a química e a fitoquímica (SILVA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014; COSTA, 2014; ARAUJO NETO, 2009; SANTOS JUNIOR, 2014), com finalidade de identificar os compostos fenólicos e as substâncias que são os princípios ativos desta família. Em se tratando do gênero *Chrysophyllum* L., são encontrados dados na literatura principalmente para as espécies *Chrysophyllum cainito* L., *Chrysophyllum flexuosum* Mart. e *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. Para *C. cainito*, o trabalho de Luo, Basile & Kennelly (2002) verificou um alto potencial antioxidante nos frutos desta espécie, para *C. flexuosum*, foi verificada a presença de substâncias com atividade antioxidante em potencial (MARQUI, 2007); a casca de

C. gonocarpum foi utilizada para isolar e identificar substâncias ativas contra um fungo de grãos de café (SANTOS JUNIOR, 2014). Baseado nesses estudos com espécies pertencentes ao gênero *Chrysophyllum*, supõe-se que *C. rufum* também apresente compostos com algumas destas propriedades citadas.

Estudos sobre a morfologia interna são muito importantes, pois os dados obtidos através das pesquisas poderão ser utilizados como subsídios em trabalhos que visem entender e esquematizar o funcionamento e estrutura da planta a partir de sua organização. A anatomia é particularmente útil para a identificação taxonômica de partes separadas de plantas, como folhas, raízes, caules, frutos ou sementes de plantas vivas ou fossilizadas. Os dados anatômicos são facilmente aplicados para melhorar a classificação e com frequência podem ser utilizados para realizar identificações (CUTLER; BOTHA & STEVENSON, 2011). A arquitetura foliar também tem se mostrado uma ferramenta muito útil para a delimitação de espécies, complementando dados sistemáticos. Hickey (1973) publicou uma classificação padronizando a arquitetura foliar e narrou que essa era uma ferramenta praticamente inexplorada devido a crença na plasticidade das características foliares. Porém é uma técnica que contribui positivamente em vários âmbitos dos estudos botânicos. O objetivo da histoquímica é localizar *in situ* os principais grupos químicos que ocorrem nos tecidos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Em se tratando de estudos morfológicos e anatômicos para a família, podemos citar, além das obras clássicas de Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1972), os estudos de Costa (2006) sobre a anatomia da madeira de espécies americanas de Sapotaceae; Monteiro *et al.* (2007) sobre anatomia foliar das espécies de *Pouteria* Aubl. do Rio de Janeiro; Almeida Junior *et al.* (2012) sobre anatomia foliar das espécies de *Manilkara* Adans. do nordeste brasileiro; e Lima *et al.* (2019) sobre a morfoanatomia do gênero monoespecífico *Diploon* Cronquist. Até o momento, somente um estudo de cunho morfológico foi realizado para *Chrysophyllum rufum*, Lima *et al.* (2017), que fez a caracterização morfológica do fruto, da plântula e da semente desta espécie afim de dar suporte para pesquisas de cunho ecológico. Estudos com enfoque anatômico e sobre a arquitetura foliar ainda são escassos.

Devido à falta de estudos sobre esta espécie, existe uma ausência de dados sobre o seu atual estado de conservação, que somado ao aumento da antropização nas áreas de ocorrência desta espécie intensifica o risco de extinção da mesma. Desta maneira, os objetivos deste

trabalho foram caracterizar anatômica e histoquimicamente as folhas de *Chrysophyllum rufum*, além de analisar a morfologia interna das folhas através da arquitetura.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-JR, E.B., ARAUJO, J.S., SANTOS-FILHO, F.S. & ZICKEL, C.S. Leaf morphology and anatomy of *Manilkara* Adans. (Sapotaceae) from Northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 1, p. 1-9, 2012.

ARAÚJO NETO, V. **Estudo das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante da *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae)**. 305 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2009.

ARMSTRONG, K. **Systematics and biogeography of the pantropical genus *Manilkara* Adans. (Sapotaceae)**. Doctor of Philosophy, Institute of Evolutionary Biology School of Biological Sciences, University of Edinburgh & Royal Botanic Garden Edinburgh. 226 pp. 2010.

BAWA, K. S. Plant-Pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.21, p.399-422, 1990.

CARNEIRO, C. E., ALVES-ARAÚJO, A., ALMEIDA Jr., E. B., TERRA-ARAÚJO, M. H. 2015. **Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14455>>.

COSTA, A. D. C. 2006. **Anatomia da madeira em Sapotaceae**. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, SP.

COSTA, D. L. M. G. da. **Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae)**. 2014. 144 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115968>>. 2014.

CUTLER, D. F.; BOTHA. T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia vegetal - uma abordagem aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

É NO SEMIÁRIDO QUE A VIDA PULSA!. **ASA Brasil** - Articulação no Semiárido Brasileiro, 26 ago. 2015. Disponível em: <https://www.asabrasil.org.br/semiarido>. Acesso em: 1 jul. 2019.

FARIA, A.D.; PIRANI, J.R.; RIBEIRO, J.E.L.S.; NYLINDER, S.; TERRA-ARAUJO, M.H.; VIEIRA, P.P.; SWENSON, U. Towards a natural classification of subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae) in the Neotropics. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.185, p. 27–55, 2017.

GOVAERTS, R., FRODIN, D.G., PENNINGTON, T.D. **World checklist and bibliography of Sapotaceae**. Kew: The Royal Botanical Garden, 361 pp. 2001.

HICKEY, L. J. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. **American Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 17-33, 1973.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Semiárido Brasileiro**. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 21 out. 2018.

LIMA, L. F. **Taxonomia e morfoanatomia foliar de *Chrysophyllum* L. e *Ecclinusa* Mart. (Sapotaceae Juss.)**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

LIMA, L. F., LIMA, R. G. V. N., FERREIRA, A. C., ALMEIDA JR., E. B., ZICKEL, C. S. Morphological characterization of fruit, seeds and seedlings of white-seal (*Chrysophyllum rufum* Mart. - Sapotaceae). **Biota Neotropica**, v.17, n. 4, e20170355. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0355>. 2017.

LIMA, R.G. V. N.; LIMA, L.F.; FERREIRA, A. C.; ARAÚJO, J. S.; ZICKEL, C. S. Leaf morphoanatomy of *Diploon* Cronquist (Sapotaceae Juss.). **Biota Neotropica**, v. 19, n. 1, e20180600. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0600>. 2019.

LINNAEUS, C. von.. **Species Plantarum** - exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Holmiae : Impensis Laurentii Salvi, 1: 192. 1753.

LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 6, p.1379-1382, mar, 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf011178n>. 2002.

MARQUI, S. R. de. **Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae)**. Araraquara: [s.n], 109 f.: il. 2007.

METCALFE, C. R., CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. London: Oxford University Press. 806p. 1972.

MONTEIRO, M.H.D.A.; NEVES, L.J.; ANDREATA, R.H.P. 2007. Taxonomia e anatomia das espécies de *Pouteria* Aublet (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, v. 58, p. 7-118. 2007.

OLIVEIRA, A.K.M; PEREIRA, K.C.L; MULLER, J.A.I; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v.32, p. 41-47, 2014.

PENNINGTON, T.D. **Sapotaceae. Flora Neotropica Monograph 52**. New York: The New York Botanical Garden. 1990.

PENNINGTON, T. D. **The genera of Sapotaceae**. The Royal Botanical Garden, Kew, 307pp. 1991.

PEREZ-MARIN, A. M. *et al.* (Org.). **O Semiárido Brasileiro: Riquezas, Diversidades e Saberes**. Campina Grande: INSA/MCTI, 2013. 73 p. v. 01. Disponível em: <<https://portal.insa.gov.br/acervo-cartilhas/699-o-semiarido-brasileiro-riquezas-diversidades-e-saberes>>. Acesso em: 15 out. 2018.

SANTOS JUNIOR, H. M. dos. **Estudo fitoquímico de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) com vistas ao desenvolvimento de novos antifúngicos**. 2010. 232 p. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2014.

SILVA, C. A. M. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SOLEREDER, H., **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford, Clarendon Press 1: [1169]-1172. 1908.

SWENSON, U. & ANDERBERG, A.A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, p. 101-130. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2005.00056.x. 2005.

ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ARQUITETURA FOLIAR DE *Chrysophyllum rufum* Mart. (SAPOTACEAE) OCORRENTE NO SEMIÁRIDO BAIANO

Artigo submetido para publicação na revista Iheringia. Série Botânica.

ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ARQUITETURA FOLIAR DE *Chrysophyllum rufum* Mart. (SAPOTACEAE) OCORRENTE NO SEMIÁRIDO BAIANO¹

Santos, R.C.S.L.², Carneiro, C.E.³

Resumo

A caracterização das folhas de *Chrysophyllum rufum* Mart. visa ampliar a base de dados sobre a espécie para que pesquisas futuras possam ser realizadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever anatômica e histoquimicamente as folhas de *C. rufum*, e analisar seu padrão de venação. O material examinado foi coletado em municípios pertencentes ao semiárido do estado da Bahia e através das técnicas realizadas foi possível observar a deposição de cera na superfície foliar, as características das células epidérmicas, a disposição dos tecidos parenquimáticos no mesofilo, os tipos de estômatos, feixe vascular central, laticíferos, bainhas de células esclerenquimáticas e a presença de compostos provenientes do metabolismo da planta (açúcares, amido, lipídios, compostos fenólicos e outros), além de visualizar através de técnica de diafanização a arquitetura da folha, podendo classificar a venação de acordo com a bibliografia específica.

Palavras-Chave: Chrysophylloideae, micromorfologia, compostos químicos, venação.

¹ Artigo proveniente de trabalho de dissertação

² Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Avenida Transnordestina, S/N, CEP 44036-900 - Feira de Santana – Bahia. risiacean.s@gmail.com

³ Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Avenida Transnordestina, S/N, CEP 44036-900 - Feira de Santana – Bahia. carneiro@uefs.br

ABSTRACT

Anatomy, histochemistry and leaf architecture of *Chrysophyllum rufum* Mart. (Sapotaceae) in the Bahia semiarid region. The characterization of the leaves of *Chrysophyllum rufum* Mart. aims to broaden the species database so that future research can be carried out. Thus, the objective of this work was to describe anatomically and histochemically the leaves of *C. rufum*, and to analyze its venation pattern. The material examined was collected in municipalities belonging to the semi - arid state of Bahia and through the techniques it was possible to observe the wax deposition on the leaf surface, the characteristics of the epidermal cells, the arrangement of the parenchyma tissues in the mesophyll, the types of stomata, and the presence of compounds derived from plant metabolism (sugars, starch, lipids, phenolic compounds and others), as well as visualizing the leaf architecture through a diaphanization technique, which can classify the venation of according to the specific bibliography.

Key words: Chrysophylloideae, micromorphology, chemical compounds, venation.

Introdução

O semiárido brasileiro é considerado a região árida mais habitada do mundo. A formação vegetal presente nessa região é a Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro. Contudo, a pressão antrópica sobre esse bioma vem se intensificando ao longo dos anos, principalmente, a partir do corte indiscriminado de espécies arbóreas nativas (Drumond *et al.*, 2008). O termo semiárido envolve uma referência climática, que marca uma característica do ecossistema desta região, que é o índice de pluviosidade baixa, isto é, menor de 800mm ao ano. O período de chuva também se restringe a três ou quatro meses durante o ano. Além disso, existe um índice de insolação grande, tendo sol quase todos os dias do ano. A temperatura varia entre 23°C e 27°C. O solo desta região é rochoso, arenoso e raso, que somado ao clima da região é apontado por estudiosos como propenso à desertificação. (Middleton e Thomas, 1992). Para a região do Semiárido, os principais tipos de vegetação são a caatinga, as florestas estacionais, os campos rupestres e o cerrado. Esses tipos de vegetação podem ser caracterizados por diferentes conjuntos de grupos taxonômicos de angiospermas. A flora do cerrado e de florestas estacionais representa a continuidade das floras do Brasil Central e da Região Sudeste, respectivamente. No entanto, as floras da caatinga e dos campos rupestres apresentam muitos elementos nativos (Silva *et al.*, 2003).

Dentre as famílias que compõem a flora da Bahia, Sapotaceae está representada por árvores, arbustos e subarbustos, com 235 espécies distribuídas em 12 gêneros (Carneiro *et al.*, 2017). Sapotaceae pertence ao clado da Ordem Ericales *sensu* APG IV (2016), juntamente com as famílias Ericaceae Juss., Ebenaceae Gürke, Symplocaceae Desf., entre outras. Atualmente são estabelecidas três subfamílias para Sapotaceae, com base em dados moleculares combinados a caracteres morfológicos (Anderberg e Swenson, 2003; Smedmark *et al.*, 2006), são elas: Chrysophylloideae, Sapotoideae e Sarcospermatoideae.

Chrysophylloideae ocorre predominantemente na América do Sul e Australásia, Sapotoideae na África e Ásia, e Sarcospermatoideae é restrita à Ásia (Swenson e Anderberg, 2005; Swenson *et al.*, 2013). Chrysophylloideae é considerado o maior agrupamento em Sapotaceae com aproximadamente 600 espécies e 28 gêneros, e com maior número de representantes nos Neotrópicos (Swenson e Anderberg, 2005; Swenson *et al.*, 2007). Dentre os gêneros desse agrupamento, está *Chrysophyllum* L. que é o segundo maior gênero de Sapotaceae, com aproximadamente 81 espécies distribuídas nos Neotrópicos. As espécies deste gênero se apresentam em forma de árvores ou arbustos, com estípulas ausentes, folhas espaçadas, geralmente alternas, venação eucamptódroma ou broquidódroma, com nervuras terciárias paralelas às secundárias e descendo da margem, inflorescência axilar em fascículos,

flores uni ou bissexuais, raramente solitárias, fruto com (1-) muitas sementes, lateralmente comprimidas, testa lisa e brilhante, e embrião vertical (Pennington, 1990).

No Brasil, *Chrysophyllum* L. está representado por 32 espécies, sendo que 12 delas ocorrem no estado da Bahia (Faria *et al.*, 2019), dentre elas está *Chrysophyllum rufum* Mart. Também conhecido como murici-de-tabuleiro no estado da Bahia (Carneiro *et al.*, 2015), esta é uma espécie arbustiva ou de árvores de pequeno porte que podem atingir até 20 metros de altura, caracterizada pelo indumento ferrugíneo na face abaxial das folhas, apresentando essa superfície muito aveludada-tomentosa com tricomas castanhos-avermelhados, flores pequenas, sépalas verdes e delicadas, e pétalas branco-esverdeadas. Os frutos são do tipo bacóide, obovóides a globosos, com uma ou duas sementes funcionais por fruto. As sementes são obovadas, hilo com forma variando de transversal elíptica a transversal oblonga (Pennington, 1990; Lima *et al.*, 2017).

Segundo a lista de espécies indicadoras dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o estado da Bahia, Resolução nº 437/2012 publicada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), *Chrysophyllum rufum* é encontrada nos estágios médio e avançado de regeneração no processo de transição de floresta de restinga para outra tipologia vegetacional. E apesar de ocorrer em vários estados das regiões nordeste e sudeste, em domínios como caatinga, mata atlântica e cerrado, ainda existem diversos obstáculos para manutenção da espécie, como, por exemplo, seu nome não consta na lista vermelha da flora do Brasil (Lima *et al.*, 2017).

Há poucos estudos com foco em anatomia foliar para a família Sapotaceae, com destaque para o de Almeida Jr. *et al.* (2012), no qual os autores caracterizam e descrevem a anatomia foliar de espécies de *Manilkara* Adans. que ocorrem no nordeste do Brasil; Monteiro *et al.* (2007a) que realizaram um estudo taxonômico e anatômico com espécies de *Pouteria* Aubl. do Rio de Janeiro; e o mais recente trabalho é o de Lima *et al.* (2019), que apresenta uma caracterização morfoanatômica das folhas do gênero *Diploon* Cronquist.

Dentre a literatura disponível, estudos com foco na taxonomia, morfologia ou anatomia de *Chrysophyllum* L. são escassos, sendo encontrados o de Lima *et al.* (2017) que caracterizou morfologicamente o fruto, a semente e a plântula de *Chrysophyllum rufum* Mart.; e o de Mbagwu, Iyama & Ikpo (2013) que traz uma comparação das características dos pecíolos entre as espécies *Chrysophyllum albidum*, *C. cainito* e *C. subnudum*, sistematizando a descrição de cada uma delas.

A presente pesquisa teve como objetivo a análise da morfologia interna das folhas de *Chrysophyllum rufum*, a identificação de substâncias ergásticas e dos compostos provenientes

do metabolismo secundário presente nesse órgão, assim como a caracterização da sua arquitetura foliar.

Material e Métodos

Material examinado: BRASIL, BAHIA, Alagoinhas, UNEB-Campus II, 17/08/2018, Santos, R.C.S.L., s/nº (HUEFS 243785)*. BRASIL, BAHIA, Coração de Maria, Estrada para Retiro, 22/09/2009, França, F., s/nº (HUEFS 20622). BRASIL, BAHIA, Feira de Santana, Campus Universidade Estadual de Feira de Santana, 24/09/2018, Santos, R.C.S.L., s/nº (HUEFS 244201)*. BRASIL, BAHIA, Jacobina, 25/08/1980, Orlandi, R.P. s/nº (HUEFS 15300). BRASIL, BAHIA, Maracás, Fazenda Juliana, 23/04/2002, Souza, E.R. de s/nº (HUEFS 59633). BRASIL, BAHIA, Morro do Chapéu, BA 052, 19/03/2019, Santos, R.C.S.L., s/nº (HUEFS 250360)*.

Os estudos morfológicos e anatômicos foram realizados no Laboratório de Micromorfologia Vegetal (LAMIV) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Anatomia

Folhas maduras totalmente expandidas, colhidas a partir do 3º nó, foram utilizadas. Destas utilizou-se o pecíolo e a lâmina foliar – dividida em base, região mediana, ápice e bordo. Após a coleta as folhas foram fixadas em FAA 70 (Johansen, 1940) e em formalina neutra tamponada - FNT (Lillie, 1965), e conservadas em etanol 70% até o processamento (Kraus & Arduin, 1997). Folhas herborizadas provenientes do acervo do Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) também foram utilizadas para ampliar a amostragem, as quais foram submetidas a reidratação em água destilada com gotas de glicerina sob fervura, em seguida submergidas em solução de hidróxido de potássio 2% para distensão celular (Smith & Smith, 1942) e estocadas em etanol 70% (Kraus & Arduin, 1997).

Para o estudo anatômico, uma parte do material foi cortado - com auxílio de lâmina de barbear - a mão livre, clarificado com hipoclorito de sódio comercial, corado com azul de astra e safranina (Bukatsch, 1972), ou azul de alcian e safranina (Luque *et al.*, 1996), e montado entre lâmina e lamínula com glicerina 50% vedada com esmalte incolor; a outra parte foi submetido a técnica de Jeffrey para dissociação da epiderme (Kraus & Arduin, 1997). Os dados métricos (tamanho das células e espessura da cutícula) foram obtidos em microscópio de luz e tratados estatisticamente. A quantidade de estômatos foi estabelecida de

* Material utilizado nos testes histoquímicos

acordo com Laboriau *et al.* (1961) com modificações, por meio de contagens em lâminas da epiderme sob microscópio de luz Zeiss Primo Star com ocular micrométrica devidamente aferida. Foram contadas 12 áreas aleatórias para cada espécime analisado, sendo quatro áreas na região basal, quatro na região mediana e quatro no ápice foliar. A contagem dos tricomas foi feita a partir das cicatrizes encontradas nas lâminas epidérmicas, seguindo o mesmo padrão da contagem de estômatos. As amostras foram analisadas em microscópio Zeiss Primo Star, e as imagens foram obtidas com auxílio de câmera Leica ICC50 W acoplada ao microscópio Leica DM500. A terminologia utilizada para as descrições anatômicas foi baseada em Metcalfe & Chalk (1983), Howard (1979), e Theobald *et al.* (1979).

Para o estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizado no Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ – Bahia), foram utilizadas amostras secas da região mediana da lâmina foliar, as quais foram coladas em *stubs* com fita de carbono dupla face, cobertas com uma fina camada de ouro 18k em metalizador Denton Vacuum Desk IV, e analisadas em microscópio JEOL JSM-6390LV.

Arquitetura foliar

A análise da arquitetura foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. foi realizada através da técnica de Foster (Macêdo, 1997), no qual a folha fresca foi previamente submetida à fervura em álcool etílico 70% por alguns minutos, em manta aquecedora, para remoção da clorofila. Em seguida, a amostra foi colocada em placa de Petri com hipoclorito de sódio comercial até a completa clarificação, sendo lavada posteriormente com água destilada por 12 horas, e submersa em hidrato de cloral por no mínimo 24 horas. A coloração foi realizada com safranina 1%, ou fucsina básica etanólica segundo Shobe & Lersten (1967 *apud* Kraus & Arduin 1997), e em seguida foram mantidas em placas de vidro com glicerina 50% (Kraus & Arduin, 1997). As estruturas foram analisadas e fotografadas em estereomicroscópio com câmera acoplada Leica EZ4 W e em estereomicroscópio Leica S8AP0 com câmera Leica EC3. A descrição da morfologia foliar e classificação da venação foliar de *C. rufum* seguiram os padrões preconizados por Ellis *et al.* (2009) e Hickey (1973).

Histoquímica

Para os estudos de histoquímica foram utilizadas seções transversais à mão livre do pecíolo e da região mediana da lâmina foliar, as quais foram submetidas a diferentes corantes e reagentes, listados no quadro 1. Testes foram realizados para a detecção de compostos lipídicos, fenólicos, polissacarídeos e a natureza dos cristais. As reações histoquímicas foram

analisadas de acordo bibliografia utilizada e fotografadas em microscópio Leica DM500 com câmera acoplada Leica ICC50 W.

Quadro 1: Grupos de metabólitos, reagentes e autores das metodologias utilizadas nos testes histoquímicos.		
Grupos de metabólitos celulares	Reagentes	Referências
Açúcares redutores	Fehling (Purvis <i>et al.</i> , 1964)	Kraus e Arduin, 1997
Hidratos de carbono		
<i>Amido</i>	Lugol (Foster, 1949)	Kraus e Arduin, 1997
<i>Polissacarídeos ácidos</i>	Azul de Alcian (Pearse, 1980)	Figueiredo <i>et al.</i> , 2007
Lipídios	Sudan III (Sass, 1951)	Kraus e Arduin, 1997
	Sudan IV (Gerlach, 1984)	Kraus e Arduin, 1997
	Ácido clorídrico 10% (Chamberlain, 1932, modificado)	Kraus e Arduin, 1997
Oxalato de cálcio	Ácido nítrico 10% (Jeffrey <i>apud</i> Johansen, 1940)	Kraus e Arduin, 1997
Substâncias fenólicas		
<i>Compostos fenólicos gerais</i>	Cloreto férrico 10% (Johansen, 1940)	Kraus e Arduin, 1997
	Dicromato de potássio (Gabe, 1968)	Figueiredo <i>et al.</i> , 2007
<i>Lignina</i>	Cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962)	Kraus e Arduin, 1997
	Floroglucinol acidificado (Johansen, 1940)	Figueiredo <i>et al.</i> , 2007
Substâncias pécicas		
<i>Pectinas e mucilagens</i>	Vermelho de rutênio (Johansen, 1940)	Figueiredo <i>et al.</i> , 2007

Resultados

Anatomia

A figura 1 (A-D) ilustra as características da superfície foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. em microscopia de luz e a figura 2 (A-D) em microscopia eletrônica de varredura. A Figura 3 (A-H) apresenta seções transversais do pecíolo e lâmina foliar em microscopia de luz.

A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta uma ornamentação estriada na face adaxial, onde a epiderme é constituída por células costais de formato retangular com paredes anticlinais lisas (Figura 1A), e células intercostais poligonais com paredes anticlinais sinuosas, que medem $1,39-1,77 \times 2,89-3,6 \mu\text{m}$, ocupando uma área de aproximadamente $1.211 \pm 197,2 \mu\text{m}^2$ células por mm^2 (Figura 1B); já na face abaxial, as células epidérmicas costais são retangulares com contorno sinuoso (Figura 1C), e as células intercostais são poligonais com paredes anticlinais muito sinuosas, medindo $1,10-1,18 \times 2,08-3,04 \mu\text{m}$ (Figura 1D). A face abaxial possui em média $1.422,4 \pm 103,3 \mu\text{m}^2$ células epidérmicas por mm^2 . A cutícula apresenta impregnação de cera e outros compostos lipofílicos na face adaxial (Figura 2A) e exibe estrias com orientação transversal, em relação ao ostíolo, sobre as células ao redor dos estômatos (Figura 2B).

Em vista transversal, a epiderme é unisseriada com apenas um estrato de células e homogênea (Figura 3A). Não foram observados idioblastos na epiderme. A cutícula, na face adaxial, apresenta-se espessa, medindo $0,58-1,08 \mu\text{m}$ de espessura; na face abaxial é menos espessa, medindo $0,33-0,83 \mu\text{m}$ (Figura 3B).

As folhas são hipoestomáticas (Figuras 1D; 2C) e os estômatos são do tipo anisocítico (Figura 1D) e encontram-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 3D). O tamanho dos estômatos pode atingir uma média de $2,12 \mu\text{m} \times 1,17 \mu\text{m}$, e o comprimento do ostíolo $1,39 \mu\text{m}$ em média. A face abaxial possui em média $593 \pm 5,9$ estômatos por mm^2 .

Tricomas tectores unicelulares do tipo malpiguiáceo, com pedúnculo curto e braço longo em forma de “T”, estão presentes na face abaxial (Figura 2D), sendo encontrados em média $777,2 \pm 8,0$ tricomas por mm^2 . Na base dos tricomas podemos encontrar de três a oito células epidérmicas de formato quadrangular com paredes anticlinais retas (Figura 1B). Na face adaxial existem cicatrizes de tricomas muito esparsas (Figura 1A-B), indicando que houve a presença deles nesta superfície em algum momento do desenvolvimento foliar; estas cicatrizes mudam a classificação da folha para glabrescente.

O mesofilo é dorsiventral, apresentando duas camadas de parênquima paliçádico e oito camadas de parênquima esponjoso (Figura 3F). As células do parênquima paliçádico são retangulares e justapostas, com comprimento cerca de 3 vezes a largura (Figura 3E). Em vista frontal, as células do parênquima esponjoso têm formato irregular, e em vista longitudinal as células apresentam formato braciforme com espaços intercelulares (Figura 3F). A lâmina foliar apresenta células de esclerênquima, do tipo fibras esclerenquimáticas, associadas ao feixe vascular; estes últimos encontram-se imersos no mesofilo, com formato irregular. Foi identificada a presença de laticíferos e idioblastos com reserva de substâncias lipídicas e látex, dispersos no mesofilo geralmente no parênquima paliçádico.

O feixe vascular, em seção transversal, apresenta formato de arco fechado, sendo a nervura central mais proeminente na face abaxial; as células epidérmicas têm as mesmas características da lâmina foliar. O parênquima paliçádico aparece de maneira descontínua, com células em formato arredondado (Figura 3C). A região cortical da face adaxial apresenta três estratos de células de colênquima angular; na face abaxial o colênquima angular está disposto em apenas um estrato (Figura 3B). A medula do feixe vascular é circundada por um cinturão descontínuo de fibras de esclerênquima (Figura 3C). Idioblastos com cristais de oxalato de cálcio estão presentes no córtex e na medula da nervura central.

O bordo das folhas é fletido (Figura 3G), possui células epidérmicas quadrangulares que adquirem formato retangular na extremidade, com dois estratos de parênquima paliçádico de células justapostas, sendo a primeira camada com células maiores que a segunda camada. O parênquima esponjoso possui oito estratos de células esparsas, globosas e braciformes. Na extremidade do bordo, em seção transversal, as células do parênquima paliçádico tornam-se arredondadas. No bordo, são encontrados vestígios de feixe vasculares, laticíferos, idioblastos e cutícula espessa com flanges (Figura 3H).

O pecíolo possui formato plano-convexo, cutícula espessa, camada de células epidérmicas uniestratificada, com paredes anticliniais retas, possui três estratos de colênquima abaixo da epiderme, medula parenquimática (Figura 3A). O feixe vascular dos pecíolos possui variação entre feixe vascular fechado e aberto com xilema interno e floema voltado para a periferia (Figura 3B). Laticíferos são notados no centro do feixe vascular, e idioblastos com cristais estão dispostos no córtex.

Histoquímica

As figuras 4 (A-F), 5 (A-F), 6 (A-F) e 7 (A-H) ilustram os resultados obtidos através de testes histoquímicos realizados no pecíolo e na região mediana da lâmina foliar.

A caracterização histoquímica de *Chrysophyllum rufum* evidenciou a presença de compostos derivados do metabolismo secundário, apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

A cutícula é mais espessa na face adaxial da folha, porém não foi notada uma maior impregnação de compostos nesta superfície devido a sua espessura. Foram encontradas gotas de lipídios nas células isoladas dos tecidos parenquimáticos (Figura 5A;D). Algumas substâncias citoplasmáticas presentes nas células da epiderme adaxial e do parênquima paliçádico reagiram ao sudan III e sudan IV (Figura 5A;B;D).

As bainhas esclerenquimáticas das nervuras foliares são lignificadas. Em termos gerais, a lignificação é mais evidente no terço médio da folha em relação ao pecíolo (Tabela 1, Figura 7G; Figura 5B).

O amido foi encontrado principalmente nas células parenquimáticas (Figura 7E;F). No pecíolo, as células com alto estoque de amido formam uma bainha amilífera em torno do feixe vascular (Figura 5C). Outros polissacarídeos também foram evidenciados em células parenquimáticas do pecíolo (Figura 4F) e na região mediana da lâmina foliar (Figura 6F).

Os açúcares redutores foram evidenciados nas células do mesofilo, tanto no pecíolo como no terço médio da lâmina foliar (Tabela 2, Figura 4E; Figura 6D).

Substâncias pécticas como mucilagens e pectinas foram observadas como composição da lamela média tanto no pecíolo quanto no terço médio foliar (Figura 5E-F; Figura 7H).

Os compostos fenólicos foram encontrados em tecidos como parênquima e colênquima no pecíolo (Figura 4A-B); já na região mediana da lâmina foliar foram detectados no parênquima e no xilema em diferentes quantidades (Figura 6C; Figura 6E). Os taninos apareceram em células isoladas do mesofilo, células do parênquima paliçádico, e impregnando a cutícula (Tabelas 1, 2; Figura 4C; Figura 6A-B).

Os testes com ácido clorídrico 10% para identificar a natureza dos cristais encontrados em meio às células de parênquima, colênquima e esclerênquima, detectaram a presença cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Figura 4D; Figura 7C).

Os tricomas não apresentaram nenhuma reação com a realização dos testes histoquímicos (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Identificação de compostos secundários no pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. por meio de testes histoquímicos.

Tecido/Estrutura	Compostos						
	Amido	Lignina	Lipídios	Açúcares redutores	Mucilagens Pectinas	Compostos fenólicos	Oxalato de Cálcio
Tricomas	-	-	-	-	-	-	-
Cutícula	-	-	+	-	-	+	-
Parênquima	+	-	+	+	+	+	+
Colênquima	-	-	-	+	+	+	+
Esclerênquima	-	-	-	-	-	-	+
Floema	-	-	-	-	-	-	-
Xilema	-	+	-	-	-	-	-

- reação negativa para o composto; + reação positiva para o composto

Tabela 2: Identificação de compostos secundários na região mediana da folha de *Chrysophyllum rufum* Mart. por meio de testes histoquímicos

Tecido/Estrutura	Compostos						
	Amido	Lignina	Lipídeos	Açúcares redutores	Mucilagens Pectinas	Compostos fenólicos	Oxalato de Cálcio
Tricomas	-	-	-	-	-	-	-
Cutícula	-	-	+	-	-	+	-
Parênquima	+	-	+	+	+	+	+
Colênquima	-	-	-	+	+	-	+
Esclerênquima	-	+	-	-	-	-	+
Floema	+	-	-	-	-	-	-
Xilema	+	+	-	-	-	+	-

- reação negativa para o composto; + reação positiva para o composto

Arquitetura foliar

A figura 8 (A-D) ilustra a folha de *Chrysophyllum rufum* Mart. e a figura 9 (A-H) apresenta o resultado da diafanização foliar.

Chrysophyllum rufum apresenta folhas simples e inteiras, discoloradas com superfície adaxial verde e superfície abaxial de cor marrom ferrugem, textura coriácea e a filotaxia é alterna (Figura 8A;C). As folhas são oblongas, têm ápices acuminados, base em formato decorrente, margens inteiras e não apresentam glândulas no limbo (Figura 8B). Tricomas malpiguiáceos recobrem toda a epiderme da superfície abaxial da folha (Figura 8D). O tamanho variou entre 5,2 – 8,4 cm compr. e 2,5 – 3,6 cm larg.

As folhas possuem venação do tipo broquidódroma e com nervura primária de orientação reta, geralmente afundada na superfície superior da lâmina foliar (Figura 9A). Possui de oito a dez pares de nervuras secundárias que se originam da nervura primária de maneira alternada, em aproximadamente 90° de ângulo (Figura 9E). Da base para o ápice, as nervuras secundárias se mostram num calibre menor que a veia principal, e as intersecundárias são ainda menores em calibre, apresentando ângulos de 90° em relação as nervuras secundárias e principal (Figura 9H; 9B). Estas nervuras intersecundárias são paralelas as nervuras secundárias (Figura 9C).

As nervuras terciárias apresentam um calibre bem menor, e dão origem as venações quaternárias e intramarginais (Figura 9D). A venação varia desde paralelas subjacentes a secundárias, com aspecto estriado horizontalmente sem ramificações (Figura 9G), até venações dicotômicas ramificadas, que formam aréolas, provenientes da venação quaternária e de ordem superior (Figura 9F).

Discussão

Os caracteres morfoanatômicos (lâmina foliar bifacial, número variável de estratos do tecido paliçádico, tecido lacunoso com grandes espaços intercelulares, cutícula abaxial ornamentada, epiderme composta de células com paredes anticlinais retas ou sinuosas, estômatos normalmente dos tipos anomocíticos e paracíticos, que raramente estão presentes acima do nível da epiderme, e fibras esclerenquimatosas no mesofilo) que foram descritos por autores (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950; Pennington, 1990; Monteiro *et al.*, 2007a; Almeida Jr. *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2019) como características diagnósticas para Sapotaceae foram observados nas folhas de *Chrysophyllum rufum*. A presença de laticíferos e tricomas malpiguiáceos juntos é caráter anatômico que permite o fácil reconhecimento de qualquer membro da família, mesmo quando em estágios estéreis (Solereeder 1908, Metcalfe e Chalk 1950, Monteiro *et al.* 2007b, Almeida-Jr *et al.* 2012).

O estudo do tecido de revestimento das folhas de *Chrysophyllum rufum* possibilitou a verificação de uma cutinização das paredes externas das células da face adaxial, que também é visível na face abaxial, porém, com dificuldade devido a quantidade de tricomas. Solereeder (1908) e Metcalfe e Chalk (1972) citaram que na face abaxial a cutícula exhibe uma ornamentação granulada ou estriada, especialmente em espécies do gênero *Pouteria* Aubl, em *Chrysophyllum rufum* a ornamentação estriada é observada na face adaxial. A presença de ceras e espessura da cutícula corroboram com informações de Esau (1974) sobre o fator de redução da perda de água realizada pela cutícula, camadas cutinizadas e a cera superficial. A espessa camada de cera na superfície foliar pode ser um sintoma da frequente falta de água no solo caracterizando como um caráter xeromórfico da planta (Fahn, 1990). Essa condição pode estar diretamente relacionada a redução da perda de água pela folha, já que a planta se encontra inserida num ambiente árido.

Solereeder (1908) descreveu que os estômatos em Sapotaceae geralmente encontram-se no mesmo nível das células epidérmicas, e que essa característica está relacionada a projeção da cutícula sobre as células guardas. Tal característica foi observada em *Chrysophyllum rufum*, principalmente através de microscopia eletrônica de varredura.

O mesofilo dorsiventral corrobora com a descrição de Metcalfe e Chalk (1972) para a família, e com Monteiro *et al.* (2007a), Almeida-Jr. *et al.* (2012) e Lima *et al.* (2019) para os gêneros *Pouteria* Aubl., *Manilkara* Adans. e *Diploon* Cronquist respectivamente. As duas camadas de parênquima paliçádico, observadas em *C. rufum*, também foram observadas por Lima *et al.* (2019) em *Diploon cuspidatum*, porém uma das camadas é composta por células de formato retangular em vista lateral.

De acordo com Pennington (1990), *Chrysophyllum rufum* possui folhas glabras na face adaxial. Entretanto, nesse estudo foi possível observar cicatrizes de tricomas nesta superfície, e uma grande quantidade de tricomas na face abaxial, o que é considerado com um carácter diagnóstico da espécie. Os tricomas, do tipo malpighiáceo, com braços longos, de diferentes tamanhos, e pedúnculo curto, também foram visualizados em *Diploon cuspidatum* por Lima *et al.* (2019). Pennington (1990) cita para a família que o indumento pode ser persistente ou decíduo, apresentando diferentes densidades nas faces adaxial e abaxial da folha, o que corrobora com as características observadas na face abaxial da espécie estudada. A quantidade de tricomas pode ser explicada pelo ambiente onde está inserido o indivíduo, pois devido às condições climáticas (climas quentes e secos, principalmente) a planta utiliza os tricomas para controlar a perda excessiva de água, ou que os tricomas mortos formam camadas protetoras evitando a evaporação excessiva (Shields, 1950)

Em Sapotaceae, os laticíferos geralmente estão distribuídos na região da nervura central, podendo ser encontrados também no mesofilo e pecíolo. Estão dispostos em fileiras longitudinais e são preenchidos com substâncias resinosas, muitas vezes acompanhados de cristais de oxalato de cálcio e amido (Solereeder 1908, Metcalfe e Chalk 1950, Metcalfe & Chalk 1983, Monteiro *et al.* 2007a). Em *Chrysophyllum*, *Pouteria* e *Manilkara*, os laticíferos podem ser observados ao longo dos feixes vasculares das nervuras, imersos no mesofilo ou ainda nas regiões corticais e medulares da lâmina foliar, respectivamente (Solereeder 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Monteiro *et al.* 2007a, Almeida-Jr *et al.* 2012). Considerada como característica diagnóstica para a família, a presença dos laticíferos em *Chrysophyllum rufum* está de acordo com a literatura, sendo encontrados principalmente na região do feixe vascular central.

Solereeder (1908) e Metcalfe e Chalk (1950) citam que a ocorrência de muitas células ricas em cristais prismáticos solitários ou aglomerados é uma boa característica diagnóstica para Sapotaceae, especialmente quando se combina com as outras características já descritas para a espécie. Idioblastos com cristais presentes no parênquima paliçádico são importantes para a delimitação taxonômica de *Pouteria* e de *Pradosia* Liais, segundo Solereeder (1908) e Monteiro *et al.* (2007a). Em *Chrysophyllum rufum*, os cristais de oxalato de cálcio estão distribuídos, em sua maioria, na região cortical da nervura principal. Lima *et al.* (2019) observaram a presença de cristais prismáticos grandes dispersos na região da nervura central e no pecíolo de folhas de *Diploon cuspidatum*, estes estão localizados com maior frequência nas primeiras camadas subepidérmica do pecíolo, o que não é observado em *Chrysophyllum rufum*.

O pecíolo de Sapotaceae foi descrito por Metcalfe e Chalk (1950) apresentando oito formas, dentre elas como plano-convexo com feixe vascular também nesse formato. Gêneros como *Diploon* Cronquist, *Pouteria* Aubl. e *Manilkara* Adans. também apresentam espécies em que o pecíolo tem essa forma, variando em algumas características, como por exemplo presença de feixes acessórios (Lima *et al.* 2019, Monteiro *et al.* 2007a, Almeida-Jr *et al.* 2012). Em *Chrysophyllum rufum*, é possível observar esse formato no pecíolo e feixe vascular com medula parenquimática, e circundado por fibras esclerenquimáticas, corroborando com Pennington (1990) e Solereder (1908).

Os resultados apontam que a anatomia foliar possui grande importância tanto para a caracterização anatômica quanto para as bases taxonômicas, já que permite a identificação de características consideradas importantes para a delimitação da espécie. E, pelo fato da família se destacar devido a sua importância econômica, servindo de matéria-prima para diversos produtos, foram realizados testes histoquímicos a fim de identificar os compostos presentes nas folhas de *Chrysophyllum rufum*.

As estruturas secretoras externas se subdividem em tricomas ou papilas, tricomas glandulares (glândulas), nectários, hidatódios e estigmas; enquanto as estruturas de secreção interna são representadas pelas células secretoras (de óleo e mucilaginosas), cavidades secretoras e laticíferos (sistema de tecido laticífero). Em Sapotaceae, encontram-se as seguintes estruturas e células de compostos ergásticos: tricomas, idioblastos (cristalíferos e oleíferos, células de óleo) e laticíferos articulados (Monteiro *et al.* 2007b).

Os compostos químicos que compõem as plantas, segundo Poser e Mentz (2001), estão divididos em compostos originários do metabolismo primário ou do metabolismo secundário; o metabolismo primário envolve os metabólitos ou macromoléculas essenciais, com funções vitais bem definidas (lipídios, protédeos, glicídios). Metabólitos secundários diferem qualitativa e quantitativamente de uma espécie para outra. Muitos compostos têm a capacidade de influenciar na polinização, dispersão de frutos em sementes, e em funções de suporte estrutural das plantas (Santos *et al.*, 2009).

Em frutos de *Manilkara zapota* e nas folhas de *Manilkara hexandra*, compostos fenólicos exercem atividade antioxidante (Baky *et al.* 2016). Em *Chrysophyllum rufum* a presença destes compostos pode ser observada tanto no tecido do parênquima quanto no colênquima e xilema.

As reações para lipídios foram positivas em *Chrysophyllum rufum*, tanto na cutícula quanto em idioblastos oleíferos no feixe vascular central, que são células que possuem conteúdo variável quanto ao tipo de óleos presentes (Dickison, 2000). Os lipídios são

considerados eficientes na prevenção da perda excessiva de água e na resistência a doenças, além de estar na composição das membranas das células (Menezes *et al.*, 2003; Taiz & Zeiger, 2004).

Dickison (2000) classificou os laticíferos como células especializadas que contém um fluido hidratado e viscoso que é exsudado pelas células quando estas sofrem algum tipo de injúria. Em *Chrysophyllum rufum* estes encontram-se dispostos no interior feixe vascular central do pecíolo.

A literatura mostra que o padrão de venação foliar fornece informações que variam entre espécies e gêneros de Sapotaceae (Lima *et al.*, 2019), e que este é importante para a distinção taxonômica das espécies (Ellis *et al.*, 2009). A descrição de Pennington (1990) para a família traz forma, organização e curso de nervuras primárias a quaternárias, além da ramificação e areolação. A análise morfológica de *Chrysophyllum rufum* mostra um padrão de venação broquidódroma que está de acordo com o descrito para a família (Pennington, 1990). A veia primária, segundo Hickey (1973), é o ponto de partida para a identificação correta das outras nervuras, geralmente é mais espessa podendo emergir do pecíolo, e esse padrão foi observado em *Chrysophyllum rufum*. As nervuras secundárias se originam diretamente da veia principal, formando um suporte estrutural para a lâmina foliar. Já as nervuras terciárias, muitas vezes paralelas às secundárias, podem formar um tecido caracterizado pelo calibre, orientação, espaçamento e curso das nervuras em relação as outras e a folha inteira. Em geral as nervuras primárias e secundárias são as principais nervuras da folha, e as terciárias fazem parte do tecido do sistema de nervuras, porém a sua regularidade varia muito e pode ser descrita em termos de “hierarquia foliar” (Ellis *et al.*, 2009; Hickey, 1973).

Os resultados deste trabalho relatam a presença de compostos primários e secundários, ressaltando a importância de testes mais específicos para a identificação de possíveis potenciais desta espécie, indicando assim os compostos biologicamente ativos.

O presente estudo contribuiu para que a descrição anatômica, histoquímica e da arquitetura de *Chrysophyllum rufum* possa ser utilizada como auxílio na identificação da espécie, visando que este conjunto de informações pertinentes a família Sapotaceae seja úteis para estudos taxonômicos e morfoanatômicos.

Considerações finais

Os resultados anatômicos, histoquímicos e de arquitetura demonstraram que foi possível realizar a caracterização das folhas *Chrysophyllum rufum*, que apresentou caracteres comuns a família Sapotaceae e representantes dela.

Características anatômicas diagnósticas da família foram confirmadas na espécie, assim como os resultados histoquímicos e da arquitetura mostraram que existe ainda a necessidade de estudos mais aprofundados para as classes de metabólitos encontrados e outros, além de uma maior determinação do padrão de venação foliar.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Jr, E. B., Araujo, J. S., Santos-Filho, F. S. & Zickel, C.S. 2012. Leaf morphology and anatomy of *Manilkara* Adans. (Sapotaceae) from Northeastern Brazil. *Plant Syst. Evol.* 299(1):1-9.
- Anderberg, A.A. & Swenson, U. 2003. Evolutionary lineages in Sapotaceae (Ericales): a cladistic analysis based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 164: 763-773.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2016: 1-20.
- Ascensão, L. 2003. Métodos histoquímicos em vegetais. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Baky, M. H. *et al.* 2016. A review on phenolic compounds from family Sapotaceae. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(2): 280.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Carneiro, C. E.; Alves-Araujo, A.; Almeida Jr., E. B.; Terra-Araujo, M. H. 2017. Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB217>>.
- Carneiro, C.E., Alves-Araujo, A., Almeida Jr., E.B., Terra-Araujo, M.H. 2015. Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14455>>.
- Chamberlain, C. J. 1932 *Methods in plant histology*. 5. ed. Chicago: University of Chicago Press, 416p.

- Conama, 2011 – Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 439, de 30 de dezembro de 2011. http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/CONAMA_RES_CONS_2012_439;14181828;20170208.pdf (Último acesso em 14/03/2016).
- Croteau, R. *et al.* 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318.
- Dickison, W.C. 2000. *Integrative plant anatomy*. Harcourt academic press, San Diego.
- Drumond, M. A., Pires, I. E., Oliveira, V. R., Oliveira, A. R., Alvarez, I. A. 2008. Produção e distribuição de biomassa de espécies arbóreas no semiárido brasileiro. *Revista Árvore* 32(4): 665-669.
- Ellis, B.; Daly D.C.; Hickey, L.J.; Johnson, K.R.; Mitchell J.D.; Wilf, P.; Wing, S.L. 2009. *Manual of Leaf Architecture*. Cornell University Press, Ithaca, New York. 190p.
- Esau, K. 1974. *Anatomia de plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher.
- Fahn, A. *Plant Anatomy*. 1990. 4th Edition. Pergamon Press, Oxford.
- Faria, A.D.; Carneiro, C.E.; Ribeiro, J.E.L.S. Chrysophyllum in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14455>>. Acesso em: 26 Ago. 2019.
- Figueiredo, A.C.S.; Barroso, J.M.G.; Pedro, L.M.G.; Ascensão, L. 2007. *Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos*. 1.ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, 80p.
- Foster, A. S. 1949. *Practical plant anatomy*. 2 ed. Princeton: D. Van Nostrand Company Inc.

- Gabe, M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson & Cie, Paris.
- Gerlach, G. 1984. *Botanische mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hickey, L. J. 1973. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany* 60(1): 17-33.
- Howard, R. A. 1979. The petiole. In: Metcalfe CR, Chalk L (eds) *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*, Oxford Clarendon, Oxford, v.1, p.88–96.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical histochemistry*. WH Freeman and Co, San Francisco.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill Book Company, 46p.
- Kraus, J. E.; Arduin, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro, EDUR.
- Laboriau, L.G.; Oliveira, J.C.; Salgado-Laboriau, M.L. 1961. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Toledo. I - Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 33(2): 238-257.
- Lillie, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3ª Ed. McGraw-Hill Book Company, New York. 751 p.
- Lima, L. F., Lima, R. G. V. N., Ferreira, A. C., Almeida Jr., E. B., Zickel, C. S. 2017. Morphological characterization of fruit, seeds and seedlings of white-seal (*Chrysophyllum rufum* Mart. - Sapotaceae). *Biota Neotropica*. 17(4): e20170355. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0355>.
- Lima, R.G. V. N.; Lima, L.F.; Ferreira, A. C.; Araújo, J. S.; Zickel, C. S. 2019. Leaf Morphoanatomy of *Diploon* Cronquist (Sapotaceae Juss.) *Biota Neotropica*. 19(1): e20180600. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0600>

- Luque, R.; Souza, C. H.; Kraus, E. J. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra pelo azul de alciano 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica*, 10(2): 199-212. Disponível em: . doi: 10.1590/S0102- 33061996000200001
- Macêdo, N. A. 1997. Manual de técnicas em histologia vegetal. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 98p.
- Mbagwu, F.N., Iyama, C.N., and Ikpo, I.N. 2013. Comparative Petiole Characteristics of *C. Albidum*, *C. Cainito* and *C. Subnudum* (Sapotaceae). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 3(19): 101-104
- Menezes, N.L. de; Silva, D. da C.; Melo-De-Pinna, G.F. de A. 2003. Folha. *In: Appezato-Da- Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M. Anatomia Vegetal Viçosa - MG: Editora UFV. p. 303-311.*
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1950. *Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses.* Oxford: Clarendon Press, v.2, p.871-880.
- Metcalf, C. R.; Chalk, L. 1972. *Anatomy of dicotyledons. Vol I.* Oxford: Clarendon Press. 1500 p.il.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1983. *Anatomy of the Dicotyledons. Volume II: Wood Structure and Conclusion of the General Introduction.* Second edition. Oxford science publications
- Middleton, N.; Thomas, D. S. G. (Eds.). 1992. *World atlas of desertification (United Nations Environment Programme).* London: Edward Arnold.
- Monteiro, M.H.D.A.; Neves, L.J.; Andreato, R.H.P. 2007a. Taxonomia e anatomia das espécies de *Pouteria* Aublet (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro. *Pesquisas, Botânica* 58: 7- 118.

- Monteiro, M.H.D.A., Andreato, R.H.P. & Neves, L.J. 2007b. Estruturas secretoras em Sapotaceae. *Pesquisas, Botânica* 58: 253-262.
- Pennington, T.D. 1990. Sapotaceae. *Flora Neotropica Monograph* 52. New York: The New York Botanical Garden.
- Pearse, A. G. E. 1980. *Histochemistry: Theoretical and applied*. 4th ed. Longman Group Limited.
- Piotto, K. D. B. 2013. Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. 157f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Poser, G. L.; Mentz, L. A. 2001. 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.
- Purvis, M.J., Collier, D.C. & Walls, D. 1964. *Laboratory techniques in botany*. London, Butterworths.
- Santos, M. C. A. *et al.* 2009. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 9(1): 24-30.
- Sass, J. E. 1951. *Botanical microtechnique*. 3ed. Iowa: State Press.
- Shields, L. M. 1950. Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. *Botanical Review* 19: 399-447.
- Silva, J.M.C., M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins (orgs.). 2003. *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília

- Smedmark, J.E.E.; Swenson, U. & Anderberg, A.A. 2006. Accounting for variation of substitution rates through time in Bayesian phylogeny reconstruction of Sapotoideae (Sapotaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 706–721.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *Am. J. Bot.* 29(6): 464–471.
- Solereder, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford, University Press.
- Swenson, U.; Anderberg, A.A. 2005. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics* 21: 101–130.
- Swenson, N., Enquist, B., Thompson, J., Zimmerman, J. 2007. The influence of spatial and size scale on phylogenetic relatedness in tropical forest communities. *Ecology* 88: 1770-80. 10.1890/06-1499.1.
- Swenson, U.; Nylinder, S. & Munzinger, J. 2013. Towards a natural classification of Sapotaceae subfamily Chrysophylloideae in Oceania and Southeast Asia based on nuclear sequence data. *Taxon* 62(4): 746–770.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, p. 309-334.

ANEXOS

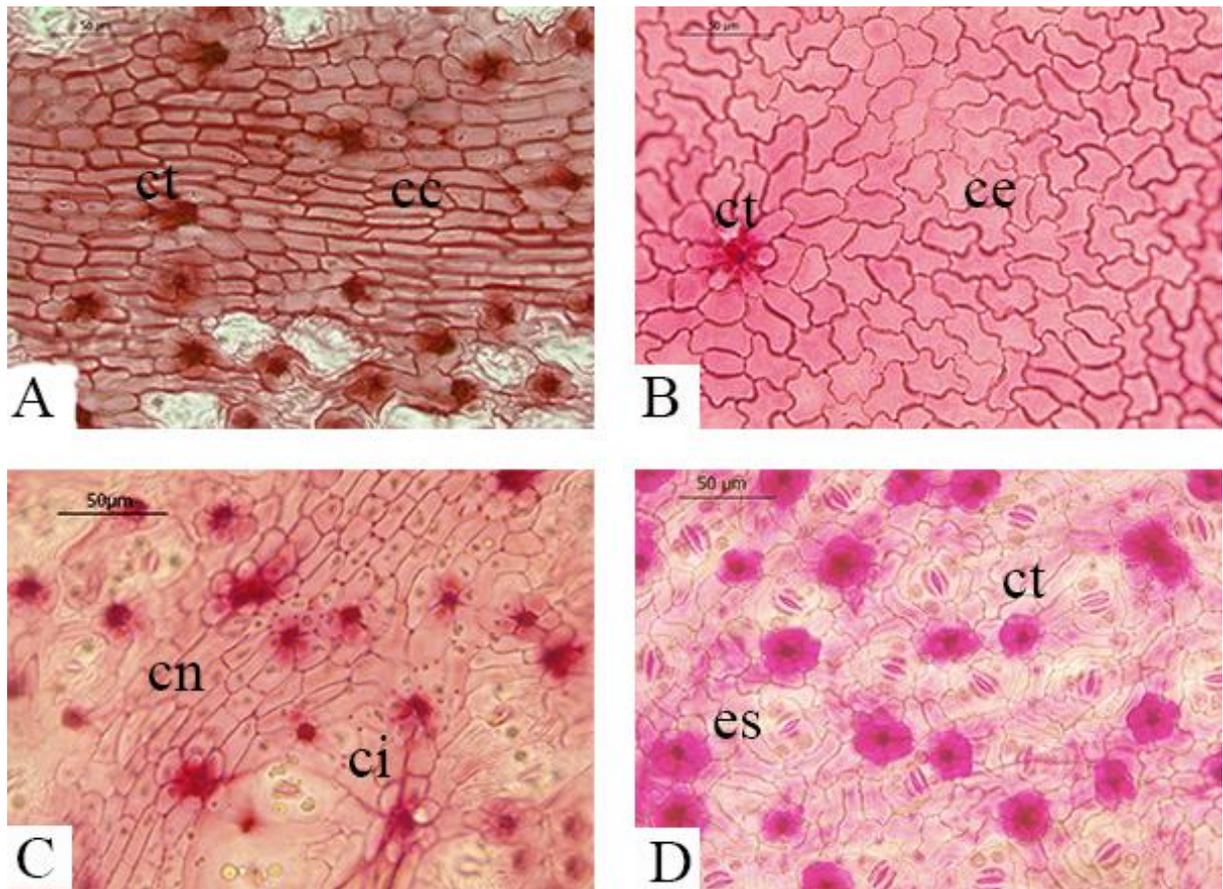


Figura 1

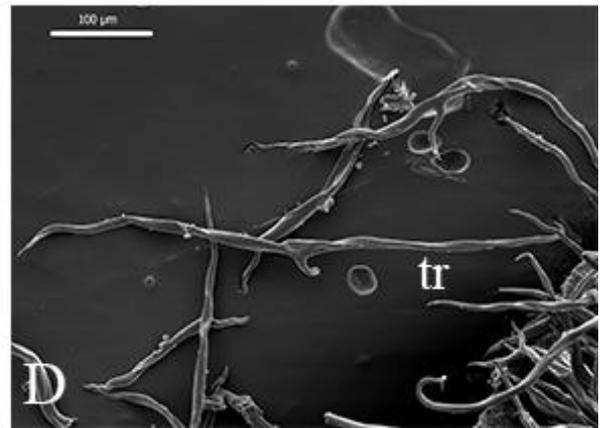
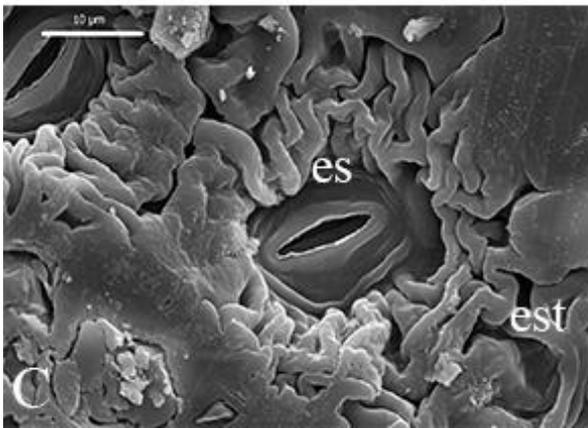
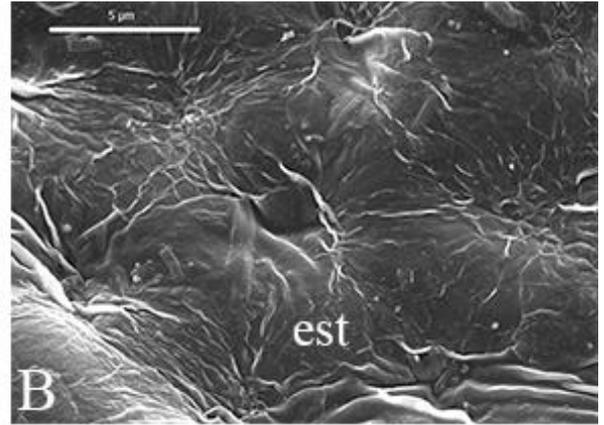
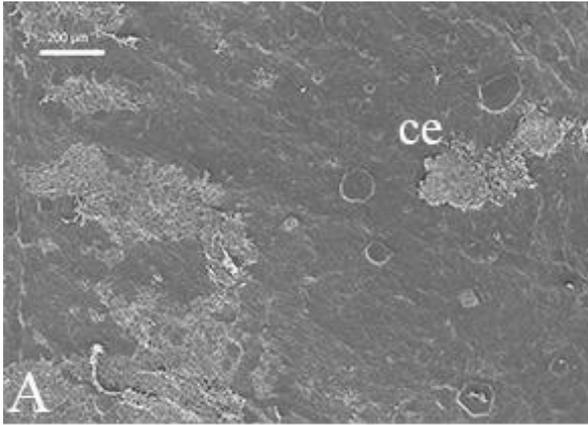


Figura 2

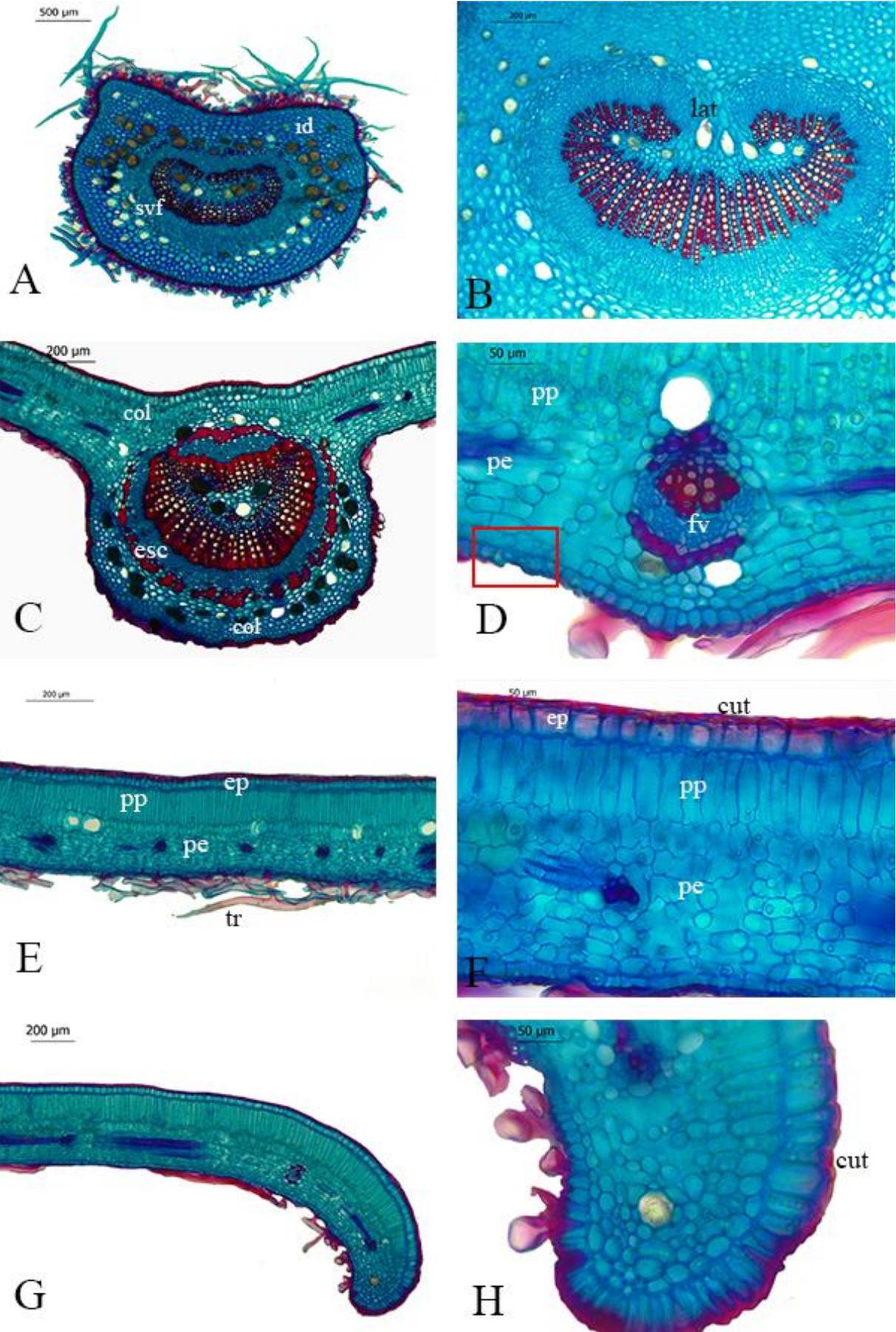


Figura 3

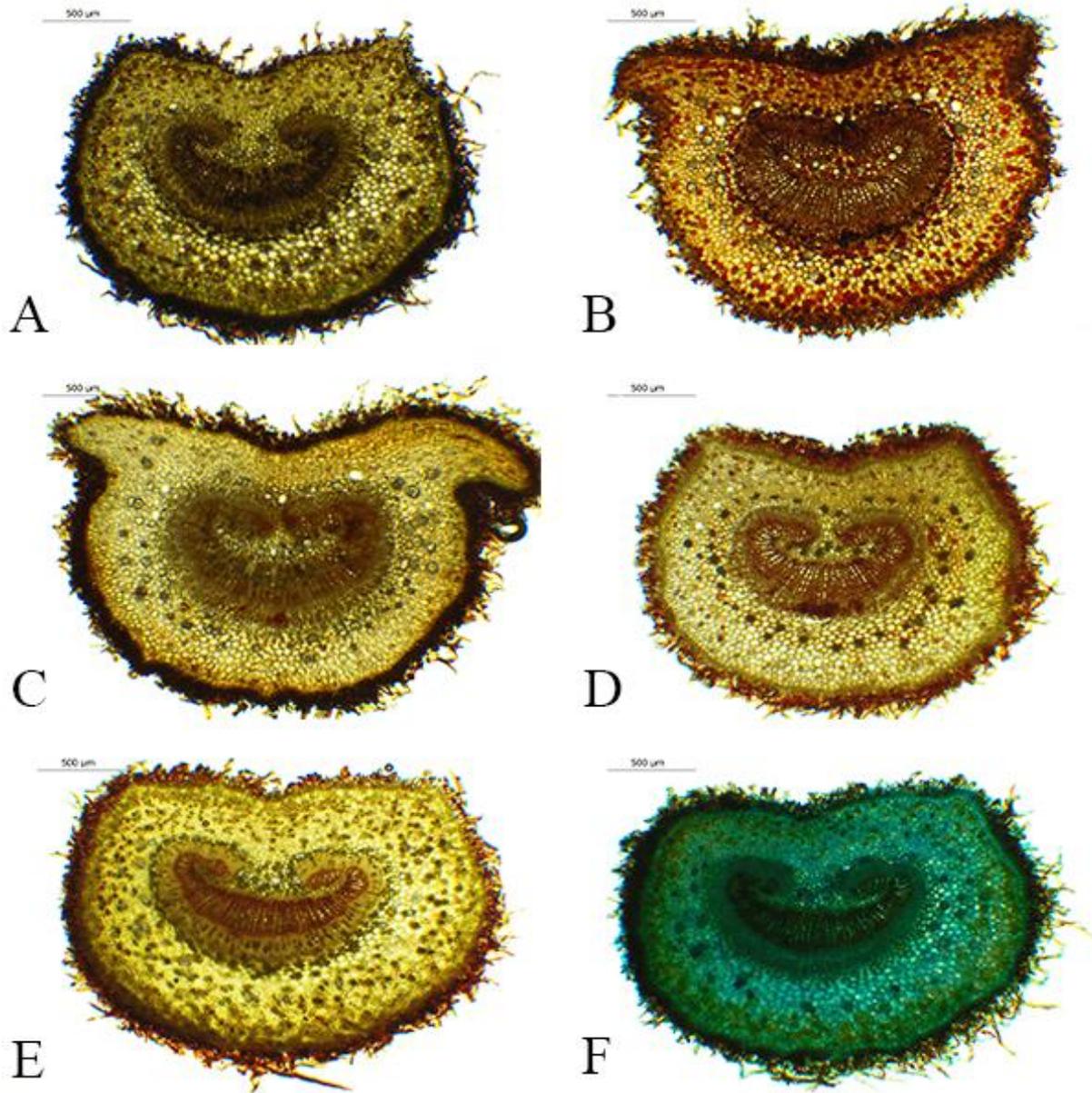


Figura 4

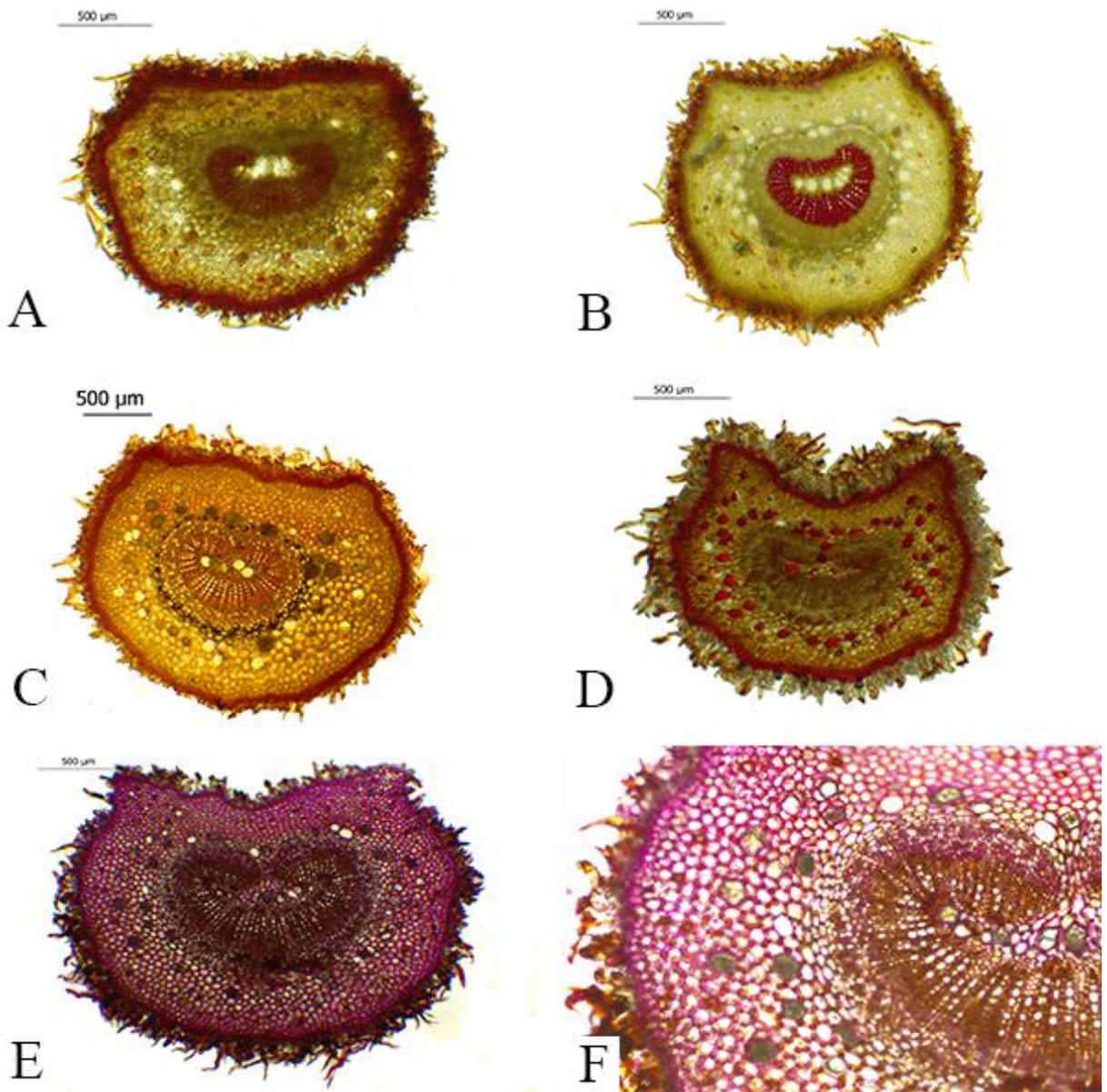


Figura 5

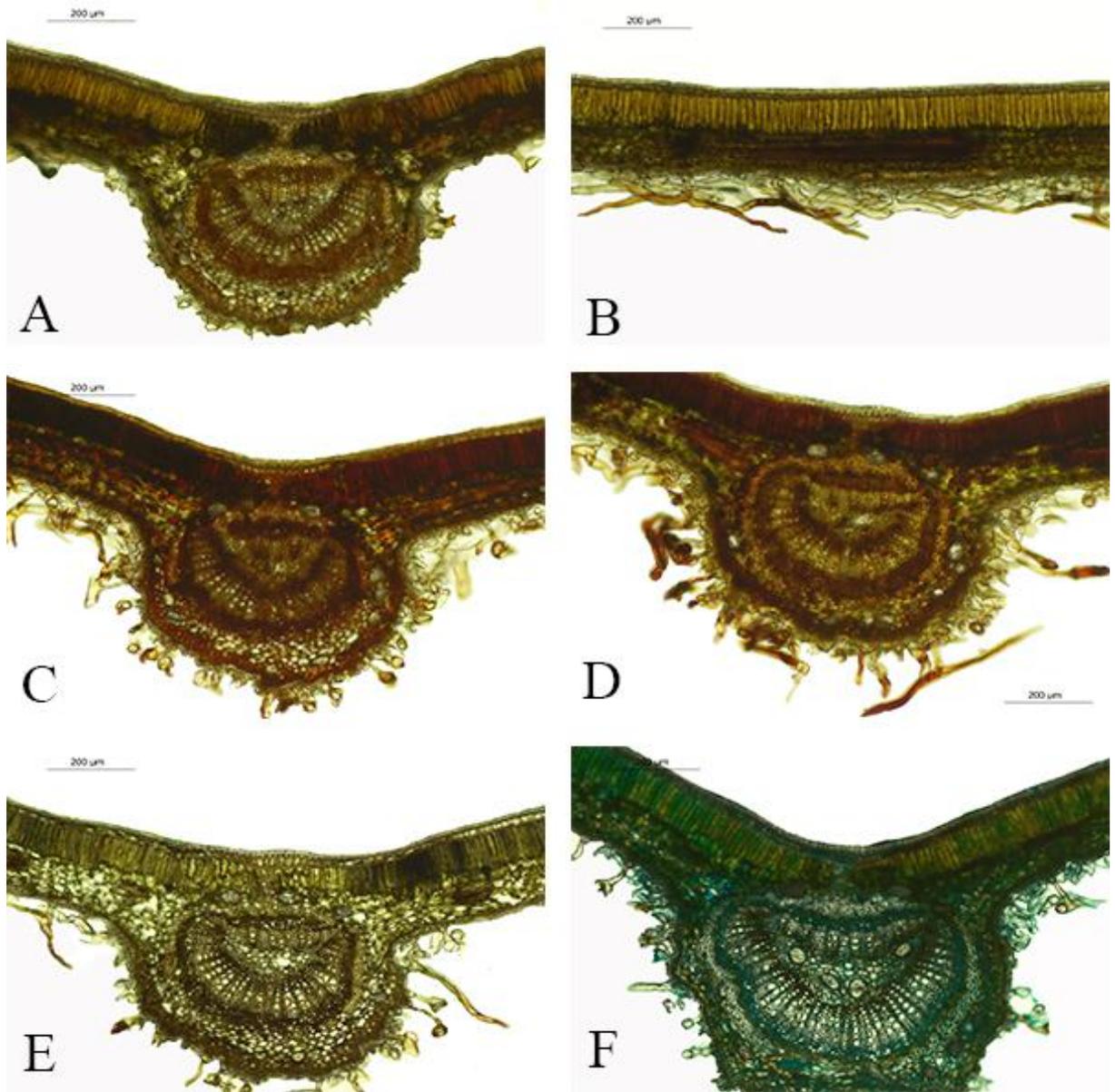


Figura 6

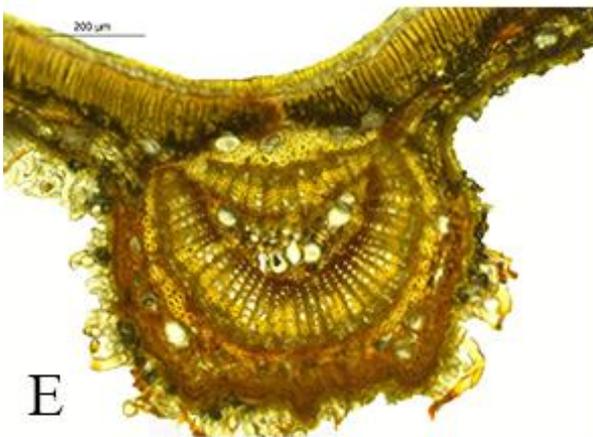


Figura 7

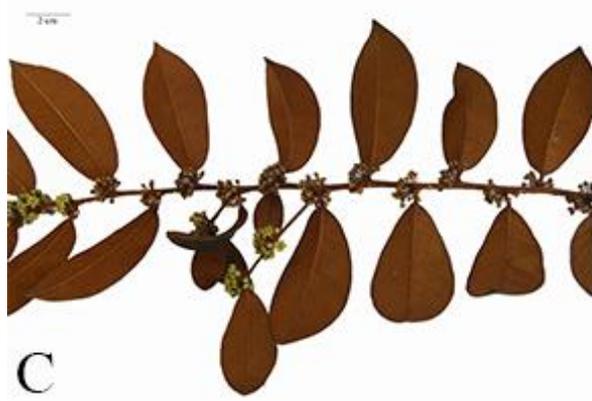


A

2 cm



B



C

2 cm



D

Figura 8

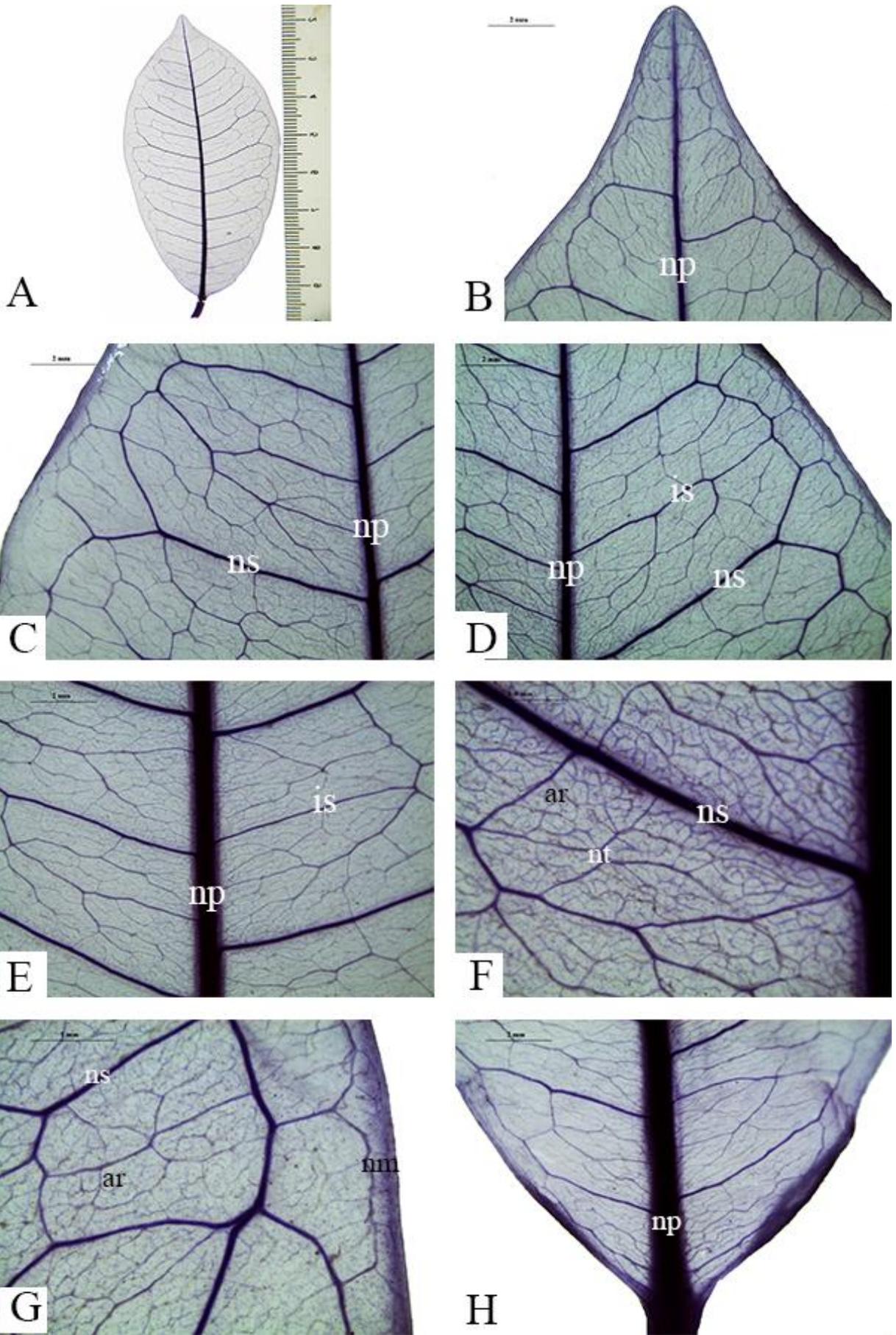


Figura 9

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Superfície foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. em vista frontal sob microscópio óptico. A-B Epiderme adaxial, mostrando células epidérmicas (ce) de paredes mais sinuosas, cicatrizes de tricomas (ct) e células costais (cc). C-D: Epiderme da face abaxial mostrando células da nervura (cn), células intercostais (ci), estômatos (es) do tipo anisocítico e cicatrizes de tricomas (ct). Barra: Figs A-D = 50 µm

Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de *Chrysophyllum rufum* Mart. em vista frontal. A-B. Superfície adaxial apresenta grande quantidade de deposição de cera (ce) e ornamentações em forma de estrias (est). C-D. Superfície abaxial mostrando estômatos (es), ornamentações estriadas (est) e tricoma (tr) do tipo malpighiáceo. Barra: Fig A= 200 µm; B=5 µm; Fig C= 10 µm; Fig D= 100 µm.

Figura 3 - Seções transversais da folha de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Pecíolo com o sistema vascular em arco fechado (svf), idioblastos (id) e laticíferos (lat). B. Detalhe da região central do pecíolo, com feixe vascular aberto (fva), floema externo (fl) e xilema interno (xl). C. Região da nervura principal da lâmina foliar mostrando cinturão de células de esclerênquima (escl) ao redor do feixe vascular (fv), células de colênquima (col) abaixo da epiderme. D. Região do mesofilo mostrando feixe vascular (fv) imerso nos parênquimas paliçádico (pp) e esponjoso (pe), destaque em quadrado vermelho para a câmara subestomática. E-F. Mesofilo dorsiventral, mostrando cutícula pouco espessa (cut), camada uniestratificada de células epidérmicas (ce), parênquima paliçádico (pp) e parênquima esponjoso (pe), tricomas (tr) malpighiáceos na face abaxial. G. Bordo foliar fletido, com tricomas na face abaxial (tr). H. Extremidade do bordo foliar mostrando flanges na cutícula (fcut), células do parênquima paliçádico arredondadas (ppa). Barra: Fig A= 500 µm; Figs B,C, E, G = 200 µm; Figs D, F, H = 50 µm.

Figura 4 – Reações histoquímicas em pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Cloreto férrico 10%. B. Dicromato de potássio. C. Cloreto de zinco. D. Etanol 100%. E. Fehling. F. Azul de alcian. Barra = 500 µm.

Figura 5 –Reações histoquímicas em pecíolo de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Sudan III. B. Floroglucina acidificada. C. Lugol. D. Sudan IV. E. Vermelho de rutênio 0,2%. F. Destaque para mucilagem corada em seção transversal do pecíolo. Barra = 500 µm

Figura 6 – Reações histoquímicas na região mediana da lâmina foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Cloreto de zinco. B. Região do mesofilo em reação ao Cloreto de zinco. C. Dicromato de potássio. D. Fehling. E. Cloreto férrico 10%. F. Azul de alcian. Barra = 200 µm.

Figura 7- Reações histoquímicas na região mediana da lâmina foliar de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Sudan III. B. Região do mesofilo mostrando a reação do Sudan III na cutícula. C. Etanol 100%. D. Sudan IV. E. Lugol, depósito de amido no parênquima paliçádico. F. Lugol, presença de amido no mesofilo. G. Floroglucina. H. Vermelho de rutênio 0,2%. Barra = 200 µm.

Figura 8- Folhas de *Chrysophyllum rufum* Mart. A-B. Superfície adaxial mostrando o ramo e as inflorescências e a folha inteira de cor verde. C-D. Superfície abaxial mostrando o ramo com flores e inflorescência e a folha inteira, destacando a coloração ferrugínea consequente da grande quantidade de tricomas. Barra = 2 cm

Figura 9- Folhas diafanizadas de *Chrysophyllum rufum* Mart. A. Folha simples, camptódroma do tipo broquidódroma, com a nervura primária (np) de orientação reta. B. Ápice foliar mostrando nervuras de menor calibre próximas a extremidade. C-D. Venação secundária broquidódroma, com nervuras marginais (nm) e intersecundárias (is). E-G. Detalhe do terço médio da folha mostrando nervuras terciárias (nt) formando aréolas (ar). H. Início da nervura primária na base da lâmina foliar (np). Barra = Fig F-G= 1mm; Figs A-E, H= 2mm.