

**ANÁLISE MORFOANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE PLANTAS DA ESPÉCIE
*DAVILLA LANOSA FRAGA***

**MORFOANATOMIC AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF *DAVILLA LANOSA*
FRAGA PLANTS**

*¹Caio Jeferson Rodrigues da Silva, ¹Taiza Andressa Vicentini, ¹Samuel Elias de Souza Rosa, ¹Wesley Franco Oliveira Pego, ²Jaqueline Martins Vasconcelos.

*¹Acadêmicos (as) do Curso de Ciências Biológicas - UNIR; ²Doutora em Botânica, docente da Universidade Federal de Rondônia

*Autor correspondente: e-mail: caiojeferson18.cj@gmail.com

RESUMO

A família Dilleniaceae possui grande distribuição no Brasil com riqueza de espécies na região Amazônica, Cerrado e Mata atlântica. Algumas espécies de plantas pertencentes a essa família apresentam propriedades medicinais, tendo como representantes plantas arbustivas, arbóreas e lianas. A anatomia foliar e histoquímica auxilia na construção de parâmetros descritivos para a espécie e localização dos metabólitos secundários. A partir da análise da anatomia e histoquímica da espécie *D. lanosa* foi evidente a presença de mucilagem possivelmente liberada pelas células idioblásticas secretoras para o armazenamento de água. Além de compostos fenólicos estruturais (parênquima cortical e mesófilo) e não estruturais (floema e mesófilo) liberados na folha e a presença de estômatos paracíticos foi apenas na face abaxial da folha. Os testes histoquímicos para amido e proteína não evidenciaram positivamente. A espécie apresentou gotículas lipídicas na epiderme e parênquima paliçádico.

Palavras-chave: Dilleniaceae, etnomedicinal, metabólitos secundários.

ABSTRACT

The Dilleniaceae family is widely distributed in Brazil with rich species in the Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. Some species of plants belonging to this family have medicinal properties, representing shrub, tree and liana plants. Leaf anatomy and histochemistry help in the construction of descriptive parameters for the species and location of secondary metabolites. From the analysis of anatomy and histochemistry *D. lanosa* showed the presence of mucilage possibly released by the secretory idioblastic cells for water storage. In addition to structural phenolic compounds (cortical and mesophyll parenchyma) and nonstructural phenomena (phloem and mesophyll) released in the leaf, the presence of paracitic stomata was only on the abaxial face of the leaf. Histochemical tests for starch and protein did not show positively. The species presented lipid droplets in the epidermis and palisade parenchyma.

Key words: Dilleniaceae, ethnomedicinal, secondary metabolites.

RESUMEN

La familia Dilleniaceae está ampliamente distribuida en Brasil con especies ricas en el Amazonas, el Cerrado y el Bosque Atlántico. Algunas especies de plantas que pertenecen a esta familia tienen propiedades medicinales, que representan plantas de arbustos, árboles y lianas. La anatomía y la histoquímica de las hojas ayudan en la construcción de parámetros descriptivos para las especies y la ubicación de los metabolitos secundarios. A partir del análisis de la anatomía e histoquímica de la especie *D. lanosa*, fue evidente la presencia de mucílago posiblemente liberado por las células secretoras idioblásticas para el almacenamiento de agua. Además de los compuestos fenólicos estructurales (parénquima cortical y mesófilo) y los fenómenos no estructurales (floema y mesófilo) liberados en la hoja, la presencia de estomas paracíticos solo estaba en la cara abaxial de la hoja. Las pruebas histoquímicas de almidón y proteína no mostraron resultados positivos. La especie presentaba gotas de lípidos en la epidermis y el parénquima empalizada.

Palabras clave: Dilleniaceae, etnomedicinal, metabolitos secundarios.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil contém uma ampla biodiversidade em relação a sua vegetação, com cerca de 55.000 espécies nativas presentes nos seis biomas: Amazônia, Mata atlântica, Cerrado, Floresta subtropical, Caatinga e Pantanal. A floresta Amazônica contém espécies de plantas com valor social e econômico, sendo classificadas como frutíferas, medicinais e oleaginosas [1].

Dentre as espécies de plantas pertencentes ao bioma Amazônico, a família Dilleniaceae é amplamente diversificada em riqueza de espécies. Para as regiões neotropicais foram identificadas cerca de 102 espécies e no Brasil ocorrem 82, ambas regiões contém indivíduos classificados dentro dos seis gêneros *Davilla*, *Neodillenia*, *Pinzona*, *Tetracera*, *Curatela* e *Doliocarpus* [8]. Essa família é representada por plantas arbustivas, lianas e arbóreas, suas folhas são simples distribuídas no ramo de modo espiral e suas flores podem ser grandes ou pequenas [2].

Diversos estudos taxonômicos ao longo do tempo identificaram novas espécies pertencentes a família Dilleniaceae em diversas regiões do Brasil e outros países. Dentre as espécies encontradas estão catalogadas e localizadas: *Doliocarpus lombardii*, *Tetracera boomii*, Brasil [3], *Tetracera forzzae*, zona da mata Minas gerais [4], *Davilla bilobata*, *D. neei*, *D. bahiana*, Brasil [5], *Doliocarpus trianaus*, *Doliocarpus schultesianu*, Colômbia [6], *D. sessilifolia*, *D. aymardii*, *D. minutifolia*, Bahia [7], *D. lanosa*, Rondônia e Amazonas [8], *D. hirsuticarpa*, floresta atlântica [9].

A maioria destas espécies pertencentes ao gênero *Davilla* são conhecidas por conterem propriedades terapêuticas utilizadas na medicina tradicional, principalmente com uso para tratar infecções e doenças [10]. As indicações etnomedicinais são para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, artrite, disenteria, diabetes, úlceras leishimaniais e inflamação [11]. E ainda dentro da família Dilleniaceae existem duas espécies *D. elliptica* e *D. rugosa* que são conhecidas tradicionalmente como cipó-caboclo ou lixeirinha que contém propriedades medicinais antiúlcera e anti-inflamatória [10].

Os autores Fraga e Stehmann (2010) descreveram novidades taxonômicas da flora brasileira (Dilleniaceae), além da descrição de uma nova espécie *Davilla lanosa* encontrada apenas em duas localidades em Rondônia e uma ao sul do Amazonas, sendo ambas achadas em florestas de terra firme [2].

A espécie *Davilla lanosa* classificada dentro do gênero *Davilla* é uma planta liana caracterizada taxonomicamente por possuir caule glabro, folhas alternas com a face adaxial

verrucosa e face abaxial lacunosa, o que confere o epíteto do espécime. Sua inflorescência é ramificada ou simples no qual seu período de florescimento ocorre apenas em junho e frutos no mês de setembro para duas localidades em Rondônia e uma ao sul do Amazonas [12].

Algumas plantas do gênero *Davilla* possuem propriedades medicinais e compostos secundários já conhecidos. Porém, as características anatômicas e histoquímicas de *D. lanosa* são incipientes. O objetivo neste trabalho é descrever a anatomia e os compostos do metabolismo secundário (histoquímica) da espécie *Davilla lanosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material coletado e Localização

Para a realização dos estudos, folhas completamente expandidas foram coletadas na reserva florestal ombrófila aberta de terra firme localizada na Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Campus José Ribeiro Filho, Porto Velho, RO (8°49'53.0"S 63°56'22.0"W) (Figura 1), na borda da mata em plantas com cerca de cinco metros de altura no mês de setembro (Figura 5). Posteriormente, o material foi conduzido para o Laboratório de Fisiologia Vegetal e Germoplasma, Porto Velho, RO em seguida foram fixadas em Karnovsky [13] por 24 horas. Ramos em estágio reprodutivo foram coletados para confecção das exsiccatas, às quais foram incorporadas ao acervo do Herbário Rodoniensis (RON) do Departamento de Biologia (UNIR).



Figura 1. Aspectos gerais da espécie *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae). Coleta do material na borda da floresta ombrófila aberta de terra firme localizada na Universidade Federal de Rondônia área antropizada (Figura A), espécie coletada do tipo liana na borda da mata em plantas com cinco metros de altura (Figura B e Figura C) com fruto do tipo cápsula maduro de coloração laranja e arilo branco contendo uma semente preta em cada arilo (Figura D).

2.2 Análise morfoanatômica

Para as análises anatômicas as amostras foram preparadas seguindo dois procedimentos: caracterização anatômica e caracterização histoquímica.

Caracterização anatômica: O material foi seccionado na região mediana da folha a mão livre utilizando lâminas de cortar de aço descartáveis e a fixação do material foi realizada em karnosky [13] durante 48 horas em geladeira. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30% até álcool etílico absoluto) e incluídas em metacrilato (Historesina Technovit 7100, Kulzer, Alemanha) conforme indicações do fabricante. Após a inclusão, o material foi seccionado em micrótomo rotativo (American Optical) e os cortes foram obtidos com espessura de 10 μm . A coloração com azul de toluidina foi realizada segundo [14] e as lâminas foram preparadas em Bálsamo-do-Canadá e lamínula. As imagens foram obtidas por fotomicroscópio (LEICA DFC295, leica Microsystems) e analisadas qualitativamente quanto ao seu aspecto morfológico.

As características anatômicas analisadas foram: Epiderme (EE); mesofilo (EM); feixe vascular (EFV); xilema (EX); floema (EF); parênquima paliçádico (EPP); parênquima lacunoso (EPL).

2.3 Análise histoquímica

As amostras utilizadas para as análises histoquímicas foram as mesmas coletadas, fixadas em karnosky e incluídas para análises anatômicas, conforme descrito no item anterior.

Para as análises histoquímicas os cortes foram corados para identificação das principais classes de metabólitos e sua localização no órgão vegetativo seguindo as indicações referenciais (Tabela 1). Todas as lâminas foram preparadas em Bálsamo-do-Canadá e lamínula, examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (LEICA DFC295, leica Microsystems) e analisadas qualitativamente quanto a presença e ausência de classes de metabólitos secundários.

Tabela 1. Testes histoquímicos feitos nos órgãos vegetativos de *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae).

Classe de metabólitos	Reagente	Referência
Lipídios totais	Sudan IV	[15]
Compostos fenólicos não estruturais	Dicromato de Potássio	[16]
Compostos fenólicos estruturais	Floroglucina acida (Lignina)	[17]
Mucilagens	Azul de toluidina	[14]
Amido	Lugol	[17]
Proteínas	Xylidine Ponceau	[18]
Compostos fenólicos não estruturais	Cloreto férrico	[17]
Compostos fenólicos totais	Formalina/sulfato ferroso	[17]

Diafanização

No processo de diafanização foliar, o terço médio das folhas medindo cerca de 2 cm² foram submetidos aos processos de branqueamento, coloração com safranina (1% em etanol 50%) e montagem de lâmina permanente [19] modificado por [20]. Durante os procedimentos foi necessário adaptar o método para obtenção das características dos estômatos da região abaxial foliar, neste processo conhecido como impressão epidérmica foram utilizados folhas fixadas em karnosky [13], estas por sua vez foram coladas utilizando-se adesivo instantâneo

universal éster de cianoacrilato (SuperBonder[®]) diretamente na lâmina e posteriormente ao secar, retirou-se rapidamente a folha mantendo somente a impressão da epiderme [21]. As imagens das superfícies abaxial e adaxial obtidas foram analisadas quanto ao formato das células epidérmicas, tipos de estômatos e morfologia dos tricomas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise morfoanatômica

A anatomia foliar interna foi evidenciada com o azul de toluidina. Foi possível observar a presença de parênquima medular (Pm) no centro do sistema vascular e xilema na região do cilindro vascular (Figura 2 A). A coloração violeta indicada pela característica metacromática do reagente azul de toluidina foi observada em células do córtex e indica a presença de mucilagem em seu interior (Figura 2 B*).

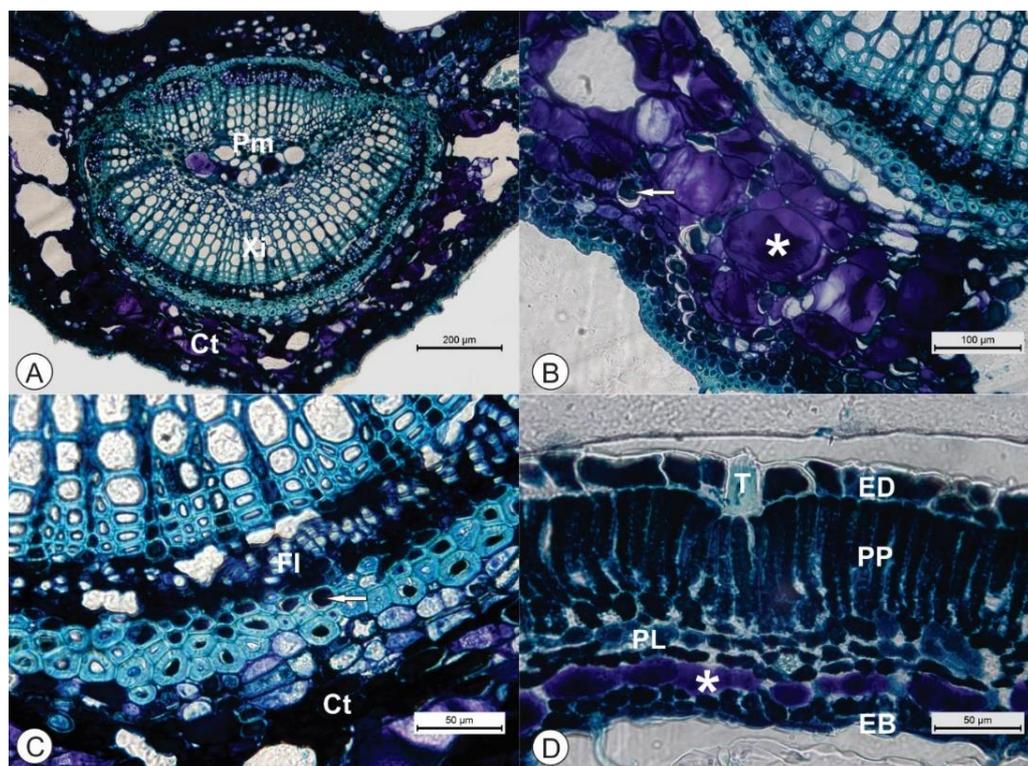


Figura 2. Seções transversais da lâmina foliar da espécie *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae). Epiderme (EE); mesofilo (EM); feixe vascular (EFV); xilema (EX): floema (FL), (Figura 2A, Figura 2B e Figura 2C); parênquima paliçádico (EP); parênquima lacunoso (PL). Tricoma tector unicelular (Figura 1 D-T)

O limbo em secção transversal apresentou epiderme superior unisseriada tanto nas faces adaxial e abaxial, porém com células menores na epiderme abaxial. O mesofilo foi caracterizado como bilateral e parênquima paliçádico do tipo contínuo unisseriado abaixo da epiderme adaxial seguido do parênquima lacunoso (Figura 2 D). Na região do limbo também foi observado a presença de mucilagem entre duas fileiras de células do parênquima lacunoso,

essa substância preenchia tanto a região do parênquima cortical, quanto o parênquima medular (Figura 2 D*). Os compostos fenólicos não estruturais foram observados em células idioblásticas secretoras na região do córtex (Figura 2 B-seta). As células da bainha de fibras no floema continham mucilagem (Figura 2 C-FI)

3.2 Diafanização

As células epidérmicas foram evidenciadas com parede espessa (Figura 3C e Figura 3D-asterisco) na face adaxial e ponto de inserção de tricomas (Pt) nas faces abaxial e adaxial (Figuras 3 A, C e D). Células epidérmicas de contorno sinuoso e tricomas tector unicelulares (Figura 3 B). Os estômatos foram classificados como tipo paracíticos e a folha é hipoestomática, por apresentar estômatos apenas na face abaxial (Figuras 3 A e 4 B).

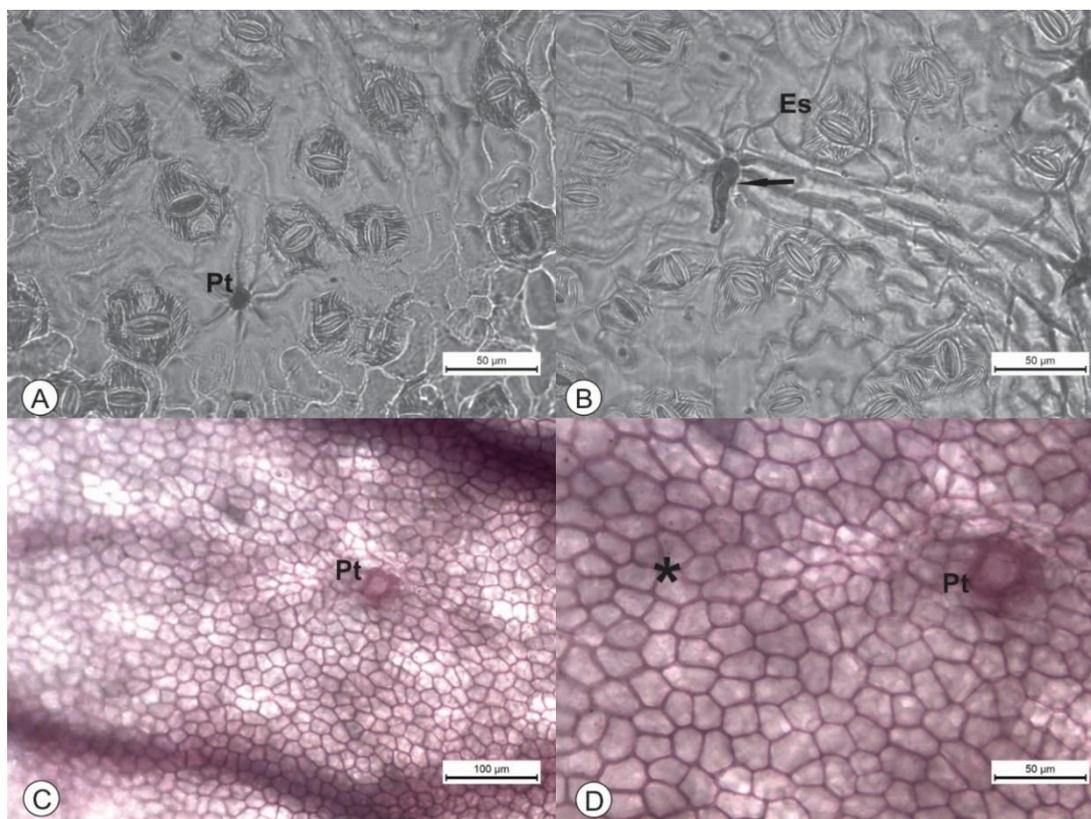


Figura 3. Vista frontal da espécie *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae). Pt: ponto de inserção de tricomas; Es: Estômatos paracíticos; Seta: tricoma tector; *células epidérmicas espessa (adaxial); células epidérmicas de contorno sinuoso (abaxial).

3.3 Análises histoquímicas

A partir da análise dos resultados, foi possível indicar a classe de metabólitos secundários e sua localização (Tabela 2).

Tabela 2. Testes histoquímicos e localização das classes de metabólitos no tecido vascular e mesófilo foliar da espécie *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae).

Classes (metabólitos secundários)	Histolocalização				
	Córtex	Epiderme	Parênquima	Floema	Xilema
Lipídios totais	-	++	++	-	-
Compostos fenólicos não estruturais (Cloreto férrico)	++	-	++	-	-
Compostos fenólicos estruturais	++	-	-	++	-
Compostos fenólicos não estruturais	+	-	+	-	-
Mucilagem	++	-	++	-	-
Amido	-	-	-	-	-
Proteínas	-	-	-	-	-
Compostos fenólicos totais	++	-	++	-	-
Reação negativa (-)	Moderadamente (+)	Positiva	Fortemente	Positiva (++)	

Os lipídios foram positivamente marcados na epiderme e no parênquima (Figura 5 D-seta), os compostos fenólicos não estruturais foram observados fortemente positivo no córtex e no parênquima lacunoso, (Figura 4 A- C, seta e Figura 4 E-G), compostos fenólicos estruturais foram marcados fortemente positivo no floema com células de parede lignificada da bainha de fibra (Figura 2 C). Os compostos fenólicos não estruturais apresentaram a mesma região de deposição da mucilagem no córtex e no parênquima lacunoso (Figura 2 B e Figura 2 D). Para o amido (Figura 4 H) e proteína (Figuras 5 E e 5 F) a reação foi negativa.

Os compostos fenólicos estruturais foram visualizados no parênquima paliçádico contínuo unisseriado (Figuras 4 C-seta e 4 G-asterisco) e no floema (Figura 4 D-asterisco) que coincide com o local de liberação de substâncias mucilaginosas pelas células idioblásticas caracterizadas com o azul de toluidina (Figura 1C-seta). Os compostos fenólicos não estruturais estão presentes no córtex e mesófilo (parênquima) (Figuras 4 A, E, F e G). O amido não foi observado (Figura 4 H).

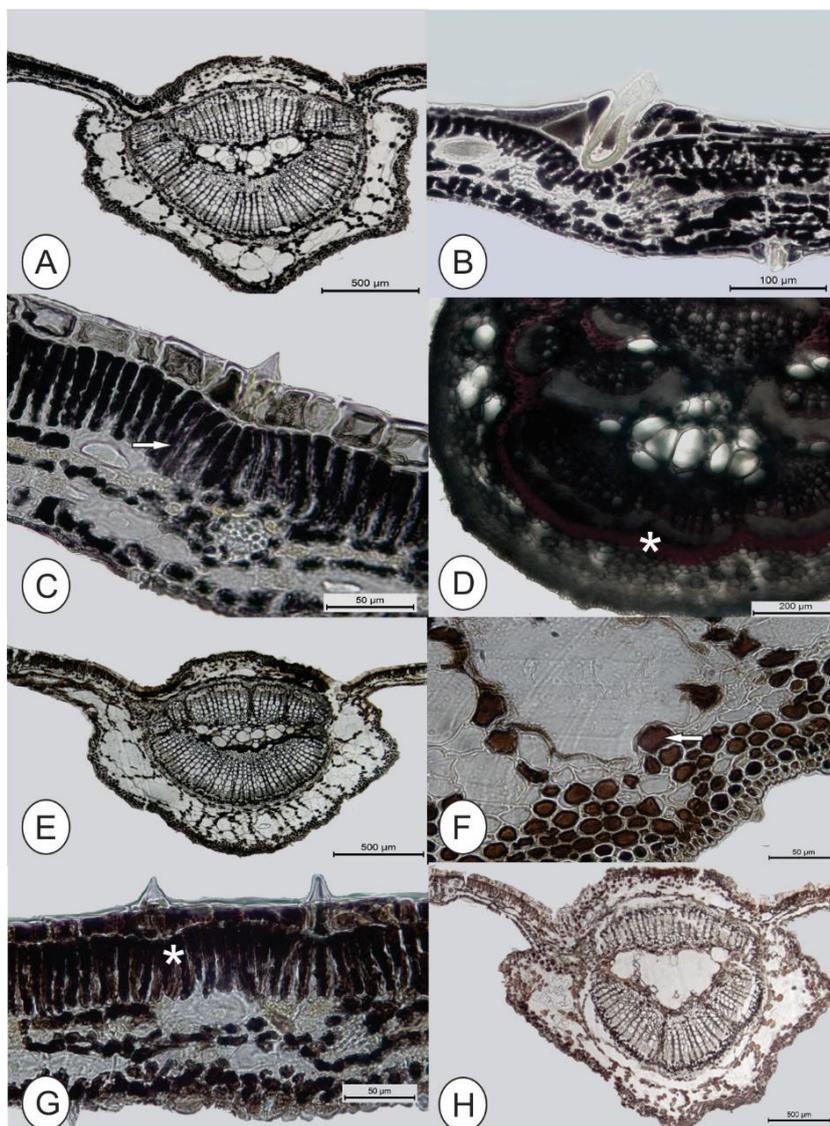


Figura 4. *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae) em seção transversal da lâmina foliar. Submetidas a testes histoquímicos. Formalina/sulfato ferroso, para compostos fenólicos totais (Figura 4 A, B e C); Floroglucina Ácida, para lignina (Figura 4 D); Cloreto Férrico para compostos fenólicos não estruturais totais (Figuras 4 E, F e G); reagente de Lugol para amido (Figura 4H).

Os compostos fenólicos não estruturais foram pouco evidentes utilizando o método de coloração de dicromato de potássio, logo, segundo a metodologia, faz-se necessário o uso de outro método de coloração com cloreto férrico para descrição correta desse composto (Figuras 5 A e B). Os compostos fenólicos estruturais estão presentes no parênquima paliçádico (Figura 5 B-asterisco) os lipídios são visualizados na epiderme, tricoma e parênquima paliçádico (gotículas lipídicas), (Figuras 5 C e D). Os testes histoquímicos para proteína não evidenciaram a presença de corpos proteicos, a coloração foi característica no mesofilo possivelmente devido a presença de proteínas rubisco (carboxilase 1,5-bifosfato de ribulose) (Figuras 5 E e F).

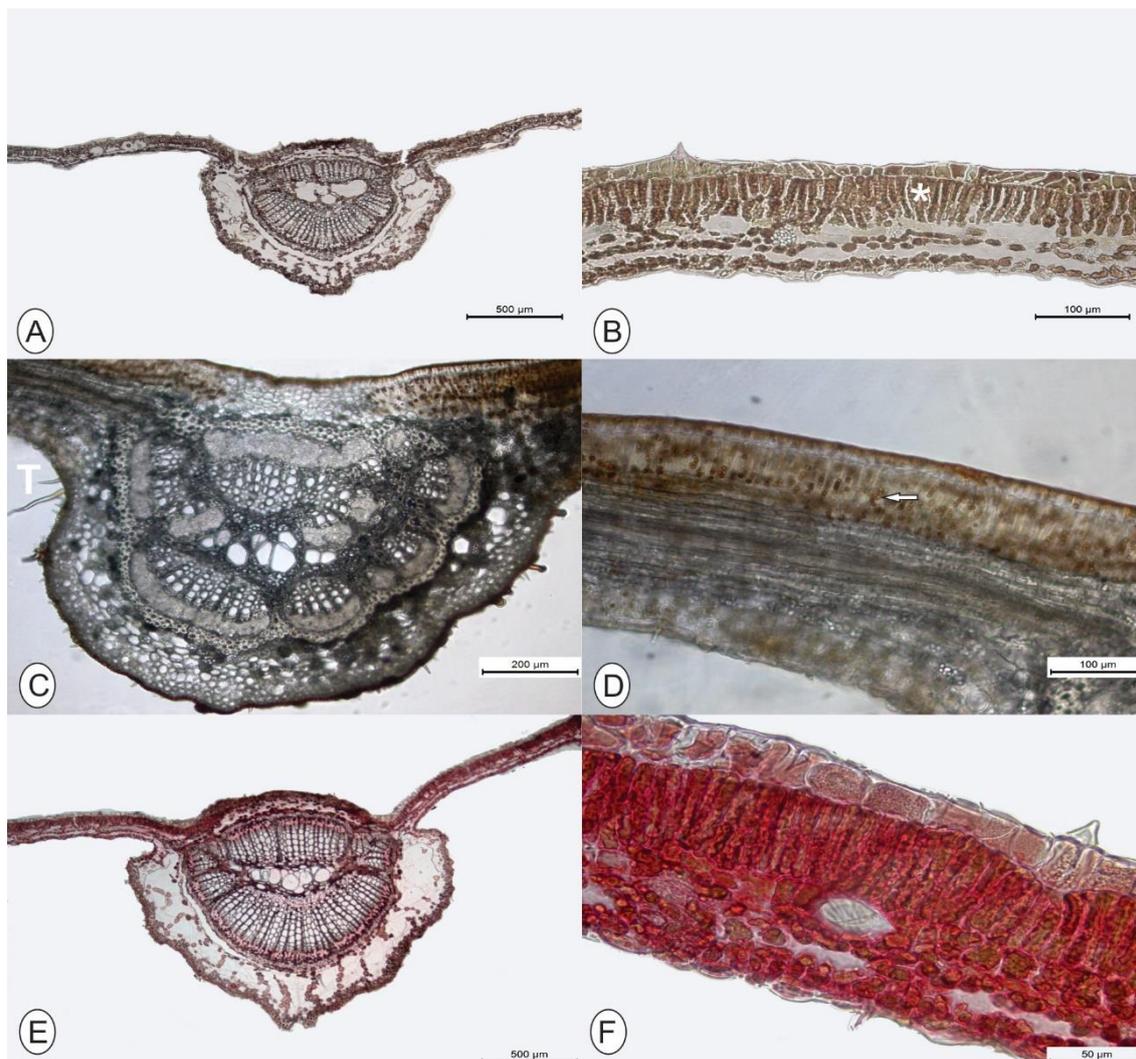


Figura 5. *Davilla lanosa* Fraga e Stehmann (Dilleniaceae). em seção transversal da lâmina foliar. Submetidas a testes histoquímicos. Dicromato de Potássio para compostos fenólicos totais (Figuras 5 A e B) Sudan IV (0,3% em etanol 70%) para compostos lipídicos, (Figuras 5 C e D); Xylidine Ponceau (0,1% em ácido acético 3%) para proteínas totais, (Figuras 5 E e F). Tricoma tector unicelular (Figuras 5 C-T)

As plantas possuem células e tecidos secretores que sintetizam e isolam substâncias em compartimentos celulares secretores (protoplasto) para posterior liberação nos espaços extracelulares dos órgãos vegetativos ou superfície externa da planta. As células secretoras são classificadas em diversos tipos, sendo estas individualizadas como tricomas ou células idioblásticas [22]. A espécie *D. lanosa* descrita neste trabalho continha células idioblásticas produtoras de mucilagem na região do parênquima cortical e parênquima paliádico semelhante a espécie *Davilla elliptica* [10]. As células idioblásticas podem secretar substâncias de natureza hidrofílica (água, néctar mucilagem ou goma). E a presença de mucilagem na região parenquimática em *Davilla lanosa* é característica de plantas suculentas que possuem a capacidade de armazenamento de água.

Os compostos fenólicos não estruturais foram evidenciados dentro de células secretoras idioblásticas na região do córtex e mesófilo e os compostos fenólicos estruturais também liberados por células idioblásticas com parede lignificada presente no floema coincide com a região corada com azul de toluidina [17]. Os compostos fenólicos em situação de estresse hídrico são acumulados no vacúolo da célula com a função de garantir a manutenção celular e integridade dos tecidos. O parênquima de preenchimento ou medular tem células com formas variadas podendo conter mucilagem ou compostos fenólicos [22].

As plantas da família Dilleniaceae podem ser caracterizadas por possuírem folhas hipostomáticas dorsiventralmente sem tricomas glandulares com a presença de tricomas tectores unicelulares [23]. Em *Davila lanosa* os estômatos foram classificados como paracíticos na região abaxial [24] e tricomas tectores em ambas as faces da lâmina foliar já descritos para a espécie *Davilla elliptica* [25,10]. Além de células epidérmicas de contorno sinuoso na região abaxial e células epidérmicas de parede espessa na face adaxial [25]. A característica levemente sinuosa das células epidérmicas na face abaxial foliar pode auxiliar a planta de terra firme a evitar a perda excessiva de água, devido as condições de alta radiação luminosa possivelmente conferindo a planta uma característica de xeromorfismo [26]. Os tricomas apresentaram-se em ambas as faces da folha como anexos epidérmicos que possivelmente auxiliam na redução da transpiração. Os tricomas são classes epidérmicas que possuem a função de reduzir a perda de água, refletir a radiação luminosa e defender contra herbivoria (interrompe o movimento de insetos ou libera através de glândulas secretoras mucilagem ou compostos tóxicos [27]).

Em condições de seca, as plantas podem apresentar em suas folhas estômatos apenas na face abaxial, menores e em maior número (regulação do fechamento estomático), sendo esse fator importante para a redução da transpiração e aumento da umidade na parte externa da folha [28]. A densidade máxima de estômatos para espécies vegetais desérticas é cerca de 415 estômatos por mm² [29,25]. Essa média de estômatos é característico de plantas xeromórficas [25]. A frequência estomática maior por unidade de área ocorre devido ao aumento das condições xeromórficas do meio ambiente o que facilita as trocas gasosas de modo eficiente quando a umidade relativa do ar for alta [30].

A fisiologia de plantas resistentes a seca é de grande importância, principalmente aquelas com valor econômico [26]. As plantas sob estresse podem sofrer mudanças e respostas na sua funcionalidade sendo reversível ou não. Os diversos fatores externos que podem causar estresse à planta não atingem de modo imediato o sítio de resposta ao estresse, ou seja, o protoplasto, devido a diversos mecanismos de proteção entre o meio ambiente e o interior

celular podendo prevenir ou até mesmo atrasar o desequilíbrio químico e termodinâmico. As plantas apresentam algumas manifestações não específicas quando estão em estado de estresse como por exemplo o acúmulo de substâncias antioxidantes e substâncias do metabolismo secundário [28].

As plantas suculentas armazenam água de reserva em tecidos especializados que possuem alta capacidade de estocagem, logo esses tecidos acomodam essa água no interior de ramos e folhas. Um dos modos de conservação dessa água na planta é o uso de carboidratos capaz de se hidratar (mucilagem) em células, cavidades entre células e ductos. Esse estoque de água reserva protege a planta contra o ponto de murcha [28].

A espécie *Davilla lanosa* apresenta mucilagem, compostos fenólicos e grande quantidade de estômatos o que possivelmente caracterizam a resistência ao estresse hídrico e outros fatores externos ambientais causadores de estresse fisiológico.

Os testes histoquímicos para análise de amido e proteína não evidenciaram positivamente esses compostos. As gotículas lipídicas encontradas na região da epiderme e parênquima paliçádico podem ser óleos essenciais constituídos pelos terpenos ou possivelmente por compostos fenólicos, mucilagem ou outras substâncias. A secreção dessas gotículas pode ser realizada por células idioblásticas, superfície epidérmica ou tricomas [22]

CONCLUSÃO

A espécie *Davilla lanosa* quando condicionada a situações de estresse hídrico e outros fatores abióticos, mantém suas atividades funcionais celulares utilizando mecanismos protetores que evitam o seu desequilíbrio químico e termodinâmico. Entre esses mecanismos a presença de mucilagem (armazenamento de água reserva), compostos fenólicos (substância antioxidante) e adaptações estomáticas contribuem para a redução da perda excessiva de água.

REFERÊNCIAS

- [1] VIEIRA, R. F. Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil. Perspectives on new crops and new uses, p. 152–159, 1999.
- [2] FRAGA, C. N. Filogenia e revisão taxonômica de *Davilla*. [s.l.] Universidade Federal De Minas Gerais, 2012.
- [3] AYMARD C., G. A New Species of *Doliocarpus* and a New Species of *Tetracera* (Dilleniaceae) from Brazil. Botanical, Missouri Press, Garden, v. 13, n. 1, p. 1–4, 2003.

- [4] FRAGA, C. N.; C., A.; A., G. *Tetracera forzzae* (Dilleniaceae), uma Nova Espécie para a Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, v. 17, n. 4, p. 433–436, 2007.
- [5] AYMARD, C. G. A. Three New Species of *Davilla* (Dilleniaceae) from Brazil. *Novon: Um Jornal para a Nomenclatura Botânica*, v. 17, n. 3, p. 282–287, 2007.
- [6] GERARDO, A. A. C. Two new species of *Doliocarpus* (Dillemaceae) from Colombia. *Novon*, v. 17, n. 3, p. 288–293, 2007.
- [7] FRAGA, C. N. Three new species of *Davilla* (Dilleniaceae) from Bahia, Brazil. *Brittonia*, v. 60, n. 4, p. 355–361, 2008.
- [8] FRAGA, C. N. AND STEHMANN, J. R. Novidades taxonômicas para Dilleniaceae brasileiras, *Rodriguésia*, v. 61, p. S01–S06, 2010.
- [9] FRAGA, C. N. AYMARD, G AND STEHMANN, J. R. *Davilla hirsuticarpa* (Dilleniaceae), a new species from the Atlantic Forest of Brazil. *Plant Ecology and Evolution.*, v. 150, n. 3, p. 367–373, 2017.
- [10] JÁCOME, R. L. R. P. et al. Artigo Estudo farmacognóstico comparativo das folhas de. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 3, p. 390–396, 2010.
- [11] LIMA, C. C.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Dilleniaceae family : an overview of its ethnomedicinal uses , biological and phytochemical profile. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 3, n. 2, p. 181–204, 2014.
- [12] FRAGA, C. N. AND & STEHMAN, J. R. Novidades taxonômicas para Dilleniaceae brasileiras. *Rodriguésia* ,v. 61, p. S01-S06., 2010.
- [13] KARNOVSKY, M. J. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, n. 1, p. 137–138, 1965.
- [14] BRIEN, T. O’ FEDER, N. AND MCCULLY, M. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, p. 367–373, 1964.
- [15] PEARSE, A. *Histochemistry: theoretical and applied* . The Williams Wilkins Co. Balt., v. 2, 1972.
- [16] GABE, M. *Techniques histologiques*. Masson Cie Paris, 1968.
- [17] JOHANSEN, D. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Books New York, 1940.
- [18] BRIEN, T. O’ AND MCCYLLY, M. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcarphi PTY. LTD Melbourne, 1981.
- [19] ARNOTT, H. J. Leaf clearings. *Turttox News*, v. 37, n. 8, p. 192–194, 1959.

- [20] LERSTEN, N. R. An annotated bibliography of botanical clearing methods. Iowa State College Journal of Science, v. 41, n. 4, p. 481–486, 1967.
- [21] BISOGNIN, F. B. S. D. A., BENEDETTI, M., VICENTE, L. C. D. C. M., & NICOLOSO, R. F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata 1. Ciência Rural, Snata Maria, v. 34, n. 5, p. 1597–1601, 2004.
- [22] APPEZZATO-DA-GLÓRIA B. AND CARMELLO-GERREIRO, S. M. Anatomia Vegetal, 2^a., v. 1, Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- [23] METCALFE, C. R. AND CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons, Oxford Univ. Press, London, 1957.
- [24] FARMACOPEIA BRASILEIRA, Farmacopeia Brasileira, 5^a edição., vol. 1. Brasília, 2010.
- [25] SOARES, M. L. REZENDE, M. H., FERREIRA, H. D., FIGUEIREDO, A. D., BUSTAMANTE, K. G., BARA, M. T., & PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* ST-Hil (Dilleniaceae). v. 15, n. 4, p. 352–360, 2005.
- [26] MEDRI, M. E. AND LLERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasillensis* Müell. Arg. (1) Moacyr, v. 10, n. 1, p. 463–493, 1980.
- [27] REECE, J. B. L. URRY, L. A. CAIN, M. L WASSERMAN, S. A MINORSKY, P. and JACKSON, R. B. Biologia de Campbell. Porto Alegre : Artmed, 2015.
- [28] LARCHER, W. A planta sob estresse. Ecofisiologia vegetal, São Carlos: Rima, 2000.
- [29] FAHN, A. and CUTLER, D. X. Xerófitas. Encyclopedia of plant anatomy. Gebruder Borntraeger. Berlin. Gebruder Borntraeger. Berlin, p. 1–177, 1992.
- [30] LLERAS, E. Differences in stomatal number per unit area within the same species under different micro-environmental conditions. A working hypothesis, v. 7, n. 4, p. 473–476, 1977.