



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Poliana Ramos Cardoso

**“ESTRUTURAS SECRETORAS EM ÓRGÃOS
VEGETATIVOS AÉREOS DE *Passiflora alata* Curtis E *P.
edulis* Sims (PASSIFLORACEAE) COM ÊNFASE NA
LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DE COMPOSTOS BIOATIVOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
POLIANA RAMOS CARDOSO
Marília de Moraes Castro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C179e	<p>Cardoso, Poliana Ramos Estruturas secretoras em órgãos vegetativos aéreos de <i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>P. edulis</i> Sims (Passifloraceae) com ênfase na localização <i>in situ</i> de compostos bioativos / Poliana Ramos Cardoso. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadora: Marília de Moraes Castro. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Passiflora alata</i>. 2. <i>Passiflora edulis</i>. 3. Estruturas secretoras. 4. Alcalóides. 5. Flavonóides. I. Castro, Marília de Moraes, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Secretory structures in the aerial vegetative organs of *Passiflora alata* Curtis and *P. edulis* Sims (Passifloraceae) with emphasis on *in situ* localization of bioactive compounds.

Palavras-chave em inglês: *Passiflora alata*; *Passiflora edulis*; Secretory structures; Alkaloids; Flavonoids.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marília de Moraes Castro, Luiza Sumiko Kinoshita, Adriana Hissae Hayashi.

Data da defesa: 21/06/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 21 de junho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marilia de Moraes Castro
Orientadora – IB/UNICAMP



Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita
IB/UNICAMP



Dra. Adriana Hissae Hayashi
Núcleo de Pesquisa em Anatomia
Instituto de Botânica – SP



Prof. Dra. Marlies Sazima
IB/UNICAMP



Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias
Universidade Federal Rural da Amazônia



À minha família, José Aparecido, Cleunice, Tatiana, Gabriel e
Gabriela, por me adubarem diariamente com determinação,
alegria, força, fé e coragem.

À minha avó, Profa. Dra. Stela Rossetini e em memória de meu
avô, Prof. Dr. Yehuda Levanon, nos quais me espelho no
amor e dedicação à ciência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Marília de Moraes Castro, agradeço a amizade e carinho ofertados a mim durante todo este período. Acredito que a nossa boa relação parte do princípio de que a senhora (sempre) quer ensinar e eu (sempre) quero aprender. E a senhora me ensinou muito. Este é o privilégio de ter sido sua última aluna, fato este do qual me orgulho muito; aproveitar esta dedicação exclusiva foi muito gratificante! O que eu mais admiro na senhora é a capacidade de me ensinar algo novo em qualquer assunto que conversamos. Confesso que adoro ouvir sobre suas experiências acadêmicas, os profissionais que conheceu, a elaboração dos trabalhos, as experiências em novos lugares... Muito obrigada por me orientar, não apenas na bancada, mas por se preocupar com a minha formação como um recurso humano. Muito obrigada por ser a pessoa que mais acreditou na realização desta tese e por muitas vezes mostrar o valor do meu trabalho quando eu mesma não enxergava. A sua trajetória de vida acadêmica apresenta uma excelência que eu sinceramente espero trilhar na minha, e se minha tese reflete esta excelência, é porque estive sob sua orientação. Muito obrigada.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, por ter possibilitado a realização do presente estudo e pela concessão da bolsa CNPq a qual fui contemplada.

Aos membros da pré-banca, Dra. Adriana Hissae Hayashi, Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias e Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita pela avaliação criteriosa da tese, sugestões e comentários que melhoraram consideravelmente a versão final. Agradeço a atenção, cuidado e tempo disponibilizados neste processo.

Aos professores do Instituto de Biologia da Unicamp pela excelente formação que recebi em minha graduação.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp pela minha formação ao longo de todo o tempo em que estive nesta instituição. Em especial, à Profa. Sandra Maria Carmello-Guerreiro, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e me apresentado ao universo da anatomia vegetal. Agradeço as duas bolsas de iniciação científica solicitadas para a FAPESP e por ter possibilitado o meu aprendizado não somente das técnicas clássicas de anatomia, mas, percebendo o meu entusiasmo, permitiu que eu tivesse acesso à microscopia eletrônica de varredura. Agradeço a percepção do meu amor pelas estruturas secretoras e pela conversa que me levou a fazer o mestrado com a Profa. Marília. Agradeço as sugestões que me ofereceu na qualificação (que melhoraram a qualidade das minhas apresentações orais) e, principalmente, o carinho que sempre teve por mim. Obrigada.

À Profa. Luiza Sumiko Kinoshita por viabilizar muitas etapas na elaboração desta tese, visto que esta pesquisa não está vinculada a nenhum projeto temático.

À Dra. Shawn Elizabeth Krosnick (Southern Arkansas University), por esclarecer minhas dúvidas, pelas discussões, sugestões, apoio e, principalmente, pela motivação.

Ao Sebastião Militão Junior ("Tião"), técnico do laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Unicamp, pela pessoa e profissional excelente que é. Agradeço pela atenção que sempre me deu, pela calma e paciência que teve comigo e por me ajudar sempre que eu precisei.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, em especial à: João Carlos, Iara, Lívia e Maria Lúcia.

Aos funcionários da secretária da Pós-graduação do Instituto de Biologia da Unicamp pela colaboração durante todo o desenvolvimento do presente estudo, em especial à Maria Roseli e Rafael Pessoa.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia (Unicamp) pelos auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães (CPQBA) por disponibilizar as espécies-alvo desta pesquisa e ao Dr. Luis Bernacci (IAC) pela identificação das plantas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Brandão (Museu de Zoologia, USP) e à Profa. Dra. Marlies Sazima pela identificação das formigas e abelhas, respectivamente.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP e IQ/UNICAMP pelo processamento das amostras e visualização em microscópio eletrônico de varredura, respectivamente. Agradeço ao Daniel Razzo pela análise dos cristais em espectroscopia por energia dispersiva de raios-x.

Ao laboratório ThoMSom de Espectrometria de Massas do IQ/UNICAMP pelo uso dos espectrômetros de massas. Agradecimentos especiais à Dra. Alexandra C.H.F. Sawaya e Msc. Nathalia Luiza Andrezza, pelo auxílio e disponibilidade em realizar as análises químicas.

À Aislan Fagundes Pascoal e Nathalia Luiza Andrezza por me disponibilizarem reagentes (DPPH e natural A, respectivamente).

À Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias. Muito obrigada pela amizade que cultivamos. Obrigada por confiar no meu conhecimento acadêmico-científico e me convidar para ministrar o curso de histoquímica no Instituto Goeldi, e pela maneira amável que me recebeu. Obrigada por sempre compartilhar seus conhecimentos, vitórias e experiências. Parabéns pelo excelente trabalho que realiza no Goeldi/UFRA, sei a alegria e a realização que você sente ao ensinar e vi o quanto você é admirada e querida. Obrigada por me apresentar pessoas das quais nunca me esquecerei: Dra. Raimunda, Dra. Alba, Tati, Carla, Thalia, Lady, Manuela, Luci, Kátia e, especialmente, o Rafael, essa pessoinha tão iluminada e querida.

À Profa. Dra. Ana Paula Stechhahn Lacchia, pelo eterno carinho que tem por mim. Obrigada por me ensinar as técnicas básicas em anatomia vegetal e por me estimular sempre. Jamais me esquecerei da alegria que eu sentia nos nossos encontros no lab (em todos os horários disponíveis na graduação) em que você me ensinava as técnicas. Tenho certeza que continua motivando pessoas da mesma forma que me motiva.

Ao Prof. Dr. Diego Demarco, meu (grande) amigo. Obrigada por todo o embasamento teórico que você me proporcionou, por me “co-orientar” na minha iniciação com estruturas secretoras – e me traumatizar com laticíferos inexistentes em *Phyllanthus* – e pela amizade que construímos.

Aos meus amigos do laboratório de Anatomia Vegetal e do Departamento de Biologia Vegetal pela melhor época da minha vida. Eu sinto uma saudade tão grande dos momentos que passamos e trabalhamos juntos, que me aperta o coração. Agradeço os amigos Aline Lopes, Carol Rio, Diego Demarco, Fabiana Firenzi, Gustavo Shimizu, Juliana Mayer, Ludmila Micheliunas, Nathalia Andrezza, Nazareth Urquiza, Priscila Cortez, Sandra Obando, Rafaela Jorge, Renata Burin, Rosina Marasca e Shesterson Aguiar.

Aos meus amigos da ecologia química, Kamila Massuda e Martin Pareja: gosto muito de estar naquele laboratório por causa de vocês.

Aos amigos da minha casa, Flávia (Flor, minha querida grande amiga), Luiz, Palocci, Déa, Babi, Clau, Jaú, Cláudia e a outra Flávia. Aos meus amigos de graduação, Bárbara Bitarello, Carlos Coquinho, Laura Prado, Vinicius Morita e Denise Nogueira.

À minha amiga em universo, Carolina Camargo Mazini, minha companheira mais leal. Aos meus amigos atemporais, André Pinho Luiz (Cabeção) e Priscila Campos.

Aos amigos Dani e William pela ajuda nos instantes finais da confecção desta tese.

À minha avó, Stelinha, e meu avô (injustamente não mais neste mundo) Levanon, meus amados. Ambos são minha fonte de admiração, incentivo e inspiração pessoal e profissional. Sempre me lembrarei do amor, carinho, respeito e admiração que mantiveram um pelo outro. Tive a felicidade de viver ao lado de pessoas tão essencialmente humanas e verdadeiramente cientistas, cujo espírito investigativo e sede de aprendizagem sempre foram priorizados, em detrimento a posições burocráticas. Orgulha-me muito ser neta de vocês.

À Gabriela Gustavson, por tanto... a senhora é tão especial na minha vida, tão querida... Obrigada por estar sempre disponível para me ouvir e por me ajudar nos momentos críticos de emoção Obrigada pela convivência com as crianças da sua escola – eu me sinto tão bem quando estou com elas que não tenho

palavras para agradecer –, pela convivência com a Fátima e as tias Michele, Mara, Paula, Neide, Luciana e Carol. Agradeço também toda sua família, Jane, Úrsula, Ana Cristina, Rui, Dra. Geni, pelo carinho que sempre tem comigo.

Aos meus pais, José Aparecido e Cleunice, e minha irmã, Tatiana, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui. Agradeço ao meu pai por cada palavra racional e sábia que sempre me oferece nos momentos tensos da vida e por comemorar comigo cada vitória; sua ética e lucidez nas situações cotidianas reflete uma pessoa admirável a quem amo muito. Agradeço minha mãe por ser a pessoa mais alegre, emotiva e parcial que conheço, e por sempre deixar explícito seu amor por mim; agradeço por todas as palavras confortantes e cheias de esperança que sempre me oferece, e pelo incentivo e suporte constantes para que eu me torne uma pesquisadora. “Te amo-te de tanto te amar”. À minha irmã, Tatiana, por ser exatamente quem é: (pessoal e intelectualmente) brilhante, entusiasmada com a ciência e sempre disposta a ensinar. Obrigada pelas palavras de conforto sempre que preciso e pelo seu amor. Você inspira as pessoas. Eu sinto muito orgulho da nossa família.

Ao Gabriel Gustavson, que me ajudou em todos os estágios na realização desta tese: dele aprendi mais do que sou capaz de dizer. Reconheço-me afortunada por ter encontrado uma pessoa que admiro por sua conduta, conselhos e julgamento, seu senso de humor e visão realista e valorosa que me trazem à realidade e, que além disso tudo, é o grande amor da minha vida.

"Hard work is painful when life is devoid of purpose. But when you live for something greater than yourself and the gratification of your own ego, then hard work becomes a labor of love"

Steve Pavlina

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	03
Introdução Geral	05
Objetivos	15
1. Capítulo 1	
Morfologia e ontogênese dos nectários extraflorais peciolares de <i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>P. edulis</i> Sims (Passifloraceae)	
Introdução	21
Materiais & métodos	24
Resultados	29
Ilustrações	39
Discussão	56
Referências	66
2. Capítulo 2	
Caracterização morfológica e estrutural das glândulas foliares marginais em <i>Passiflora edulis</i> Sims e <i>P. alata</i> Curtis (Passifloraceae)	
Introdução	77
Materiais & métodos	80
Resultados	84
Ilustrações	92
Discussão	107
Referências bibliográficas	115
3. Capítulo 3	
Localização <i>in situ</i> de compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos de <i>Passiflora alata</i> e <i>P. edulis</i> Sims (Passifloraceae)	
Introdução	123
Materiais & métodos	127
Resultados	130
Ilustrações	134
Discussão	145
Referências bibliográficas	154

Discussão geral e considerações finais	163
Perspectivas	175
Referências (Introdução e Discussão gerais)	178

“Estruturas secretoras em órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae) com ênfase na localização *in situ* de compostos bioativos”

RESUMO

Esta tese tem como principal objetivo contribuir para o conhecimento morfológico das glândulas dos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims e localização dos compostos bioativos responsáveis pela reconhecida importância farmacológica apresentada por estas espécies. Técnicas em microscopias fotônica e eletrônica de varredura são utilizadas na observação da morfologia das glândulas, visualização dos compostos fenólicos presentes no interior destas estruturas e exame da micromorfologia dos cristais; a espectrometria por energia dispersiva de raios-x é empregada na identificação dos átomos constituintes dos cristais. Testes histoquímicos convencionais e de fluorescência são aplicados nas glândulas para a caracterização *in situ* do exsudato; estes procedimentos são acoplados à análise do exsudato em espectrometria de massas (MS). Os principais pontos abordados na tese são: a validação das glândulas presentes nos pecíolos e lâminas foliares de ambas as espécies como nectários extraflorais (NEF); identificação das glândulas estipulares de *P. alata* como coléteres; a localização de alcalóides e flavonóides no interior dos idioblastos dispersos nos tecidos vasculares, majoritariamente no floema, do caule e da folha destas espécies. A morfologia, coloração e variação no número de NEF peciolares de *P. alata* indicam que estas glândulas atuam como *egg mimics*, estruturas miméticas de ovos de borboletas Heliconiini – principal consumidor de espécies de *Passiflora* – que previnem a oviposição destes insetos. Ainda, estas glândulas apresentam idioblastos dispersos no parênquima cujo conteúdo é composto por terpenos e, neste contexto, a morfologia crateriforme pode propiciar um microambiente de contenção de voláteis nos NEF peciolares de *P. alata*. A análise dos cristais presentes no parênquima nectarífero dos NEF peciolares de ambas as espécies identificou cristais do tipo agregado cristalífero, cuja composição é de oxalato de cálcio, e areia cristalífera, constituída por átomos de ferro, em *P. alata* e drusas de oxalato de cálcio em *P. edulis*. O registro de ferro armazenado fora do cloroplasto é inédito. A análise química qualitativa do exsudato proveniente dos NEF peciolares e laminares de ambas as espécies evidenciou açúcares e, em menor concentração relativa, flavonóides e

alcalóides – exceto nos NEF peciolares de *P. alata*. A detecção de diferentes tipos de açúcares no exsudato das glândulas estipulares de *P. alata* corrobora sua identificação como coléteres. Em ambas as espécies, a localização dos idioblastos dispersos nos tecidos vasculares contendo alcalóides e flavonóides sugere uma translocação destes compostos pelos elementos de tubo crivado para diferentes órgãos e acúmulo nos idioblastos. A técnica usada para estimar a atividade antioxidante de compostos *in vitro* com o uso do reagente DPPH foi adaptada para a observação *in situ* desta reação, evidenciando esta atividade nos idioblastos contendo flavonóides em ambas as espécies. Os estudos histoquímicos aliados às análises do néctar em MS sugerem uma relação entre as diferentes concentrações de alcalóides e flavonóides no interior e fora da planta, em que a alta concentração destes compostos apresenta efeito dissuasivo, comprometendo o desenvolvimento de herbívoros, enquanto a baixa concentração não acomete o crescimento dos coletores mutualistas. Este trabalho inova ao integrar técnicas distintas na caracterização das estruturas secretoras e do exsudato por elas produzido.

Palavras-chave: *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, nectários extraflorais, alcalóides, flavonóides.

“Secretory structures in aerial vegetative organs of *Passiflora alata* Curtis and *P. edulis* Sims (Passifloraceae) with emphasis on *in situ* localization of bioactive compounds”

ABSTRACT

The purpose of the present study is to contribute to the morphological knowledge of the glands present in aerial vegetative organs of *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims and *in situ* localization of bioactive compounds responsible for the recognized pharmacological importance of both species. Scanning electron and photonic microscopy techniques are applied to the observation of glands morphology, visualization of phenolic compounds into these structures and the examination of crystals micromorphology; the energy dispersive x-ray spectrometry is applied to identify the constituent atoms of crystals. Conventional histochemical tests and fluorescence are applied to the glands for *in situ* characterization of exudate; these procedures have been coupled with the analysis of exudate in mass spectrometry (MS). The main points of this research are the validation of the glands present in the petiole and leaf blade of both species as extrafloral nectaries (EFN) and of stipular glands of *P. alata* as colleter; the *in situ* localization of alkaloids and flavonoids within the idioblast scattered through the vascular tissue, mainly in the phloem, in stem and leaves of these species. The morphology, color and variation in number of petiolar ENF of *P. alata* indicate that these glands act as egg mimics, mimetic structures of the Heliconiini butterflies eggs – the main consumer of *Passiflora* species – that prevent oviposition of these insects. Nevertheless, these glands possess idioblasts that synthesize terpenes. In this context, the crateriform morphology of petiolar ENF of *P. alata* may provide a microenvironment for holding volatile. The analysis of crystals present in the petiolar nectariferous parenchyma of both species identified aggregate crystals, whose composition is calcium oxalate, and crystal sand, consisting of iron atoms in *P. alata*, and druses of calcium oxalate in *P. edulis*. This is the first record of iron stored outside the chloroplast. The qualitative chemical analysis of the exudate from petiolar and laminar ENF of both species detected sugar and lower concentrations of flavonoids and alkaloids – except in the petiolar ENF of *P. alata*. The identification of different types of sugars found in stipular glands exudate of *P. alata* confirms its identification as colleter. In both species, the location of idioblasts containing alkaloids and flavonoids scattered through the vascular

tissue suggest a translocation of those compounds through sieve-tube members of phloem to different organs and their consequent accumulation inside the idioblasts. The technique used in order to estimate the antioxidant activity of compounds *in vitro* with the aid of DPPH reagent was adapted for *in situ* observation of this reaction, showing this activity in idioblasts synthesizing flavonoids in both species. Histochemical studies coupled with nectar analysis in MS suggest a relationship between the different concentrations of alkaloids and flavonoids inside and outside the plant, where high concentration of these compounds has a deterrent effect, endangering the development of herbivores, while low concentration does not affect the mutualistic collectors growth. This work innovates by integrating different techniques for the characterization of the secretory structures and the exudate produced by them.

Keywords: *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, extrafloral nectaries, alkaloids, flavonoids.

INTRODUÇÃO GERAL

Passiflora alata Curtis e *Passiflora edulis* Sims, espécies nativas do Brasil, e *Passiflora incarnata* L., nativa da América do Norte (Killip 1938), apresentam reconhecido valor farmacológico (Farmacopéia Brasileira 1977, Farmacopéia Helvética 1987, Farmacopéia Italiana 1988, Farmacopéia Alemã 1992, Farmacopéia Européia 1996, Farmacopéia Americana 2000) e econômico (Oliva *et al.* 1996, Dornelas *et al.* 2006) por possuírem compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos utilizados no tratamento de distúrbios psíquicos (Graeff & Guimarães 1999; Petry *et al.* 2001; Dhawan *et al.* 2001a,b,c; 2004; Otobone *et al.* 2005; Akhondzadeh & Maleki 2006; Castro *et al.* 2007), destacando-se os efeitos ansiolítico e sedativo (Petry *et al.* 2001; Dhawan *et al.* 2001c, 2004; Otobone *et al.* 2005; Akhondzadeh & Maleki 2006; Castro *et al.* 2007). Ainda, os extratos destas plantas são utilizados no tratamento de insônia, epilepsia, tétano e espasmos musculares (Dhawan *et al.* 2001a), apresentando atividade antioxidante, antimicrobiana (Bendini *et al.* 2006), cicatrizante (Bezerra *et al.* 2006) e citotóxica (Yudasheva *et al.* 2005).

Embora existam trabalhos que identifiquem os compostos bioativos presentes em espécies de *Passiflora*, não há resultados conclusivos que indiquem quais classes de compostos químicos promovem ação sobre o sistema nervoso central, e se estas atividades biológicas são realizadas por um composto isolado ou por grupos de compostos químicos presentes em órgãos aéreos (Pereira & Vilegas 2000; Dhawan *et al.* 2001b, 2004).

Compostos bioativos em *Passiflora*

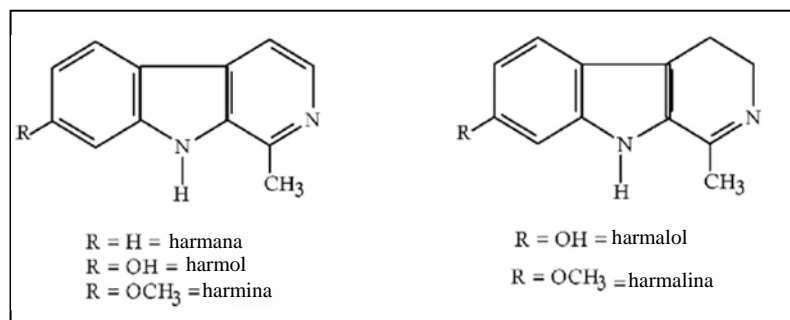
Estudos farmacológicos e de bioprospecção referentes às espécies de *Passiflora* evidenciam que os compostos bioativos presentes nos órgãos vegetativos aéreos são

principalmente **alcalóides** (Lutomski 1959, 1967; Lutomski & Wrocinski 1960; Lutomski *et al.* 1968, 1974, 1975; Benatti & Fedeli 1968; Benatti 1971; Lutomski & Malek 1975; Dhawan *et al.* 2001b, 2004), **flavonóides** (Oga *et al.* 1984, Freitas 1985, Proliac & Raynaud 1988, Li *et al.* 1991, Moraes 1995, Rhaman *et al.* 1997, Pereira & Vilegas 2000, Dhawan *et al.* 2001a, 2004) ou um **complexo alcalóide-flavonóide** (Lutomski *et al.* 1974, 1975).

Alcalóides são substâncias de caráter básico e baixo peso molecular, que contêm um ou mais átomos de nitrogênio combinados como parte de um sistema cíclico, distintos em grupos baseados em suas moléculas precursoras (DeLuca & St-Pierre 2000, Makkar *et al.* 2007). Normalmente, estes compostos são encontrados em todos os órgãos da planta em qualquer estágio de desenvolvimento (Hartmann & Dierich 1998). A função primordial dos alcalóides nas plantas é de defesa contra insetos e patógenos, devido à sua alta toxicidade (Williams *et al.* 1989, Hartmann & Witte 1995, Hartmann & Dierich 1998, Makkar *et al.* 2007).

Os **alcalóides** encontrados no gênero *Passiflora* são do tipo indólico simples, derivados do sistema β -carbolina: harmana, harmol, harmalol, harmalina e harmina (Lutomski 1959, 1967; Lutomski & Wrocinski 1960; Lutomski *et al.* 1974, 1975; Oga *et al.* 1984; Pereira & Vilegas 2000, Dhawan *et al.* 2004), cujas estruturas são apresentadas no quadro 1. Na literatura, os teores de alcalóides descritos são baixos, com concentrações em torno de 10^{-5} mol/g (Copeland & Slaytor 1974, Oga *et al.* 1984, Pereira & Vilegas 2000, Zuanazzi & Montanha 2001, Dhawan *et al.* 2004).

Quadro 1. Estrutura química dos alcalóides descritos em *P. alata* e *P. edulis*.



(adaptado de Dhawan *et al.* 2004)

Flavonóides são compostos cuja estrutura química consiste em quinze carbonos organizados em dois anéis fenólicos (anéis A e B) ligados por uma ponte de três carbonos (anel C). Estão divididos em diversas classes, como antocianinas, flavonas, flavonóis, favanonas, dihidriflavonóis, chalconas, auronas, flavononas, isoflavonóides, biflavonóides, e são encontrados em todos os órgãos das plantas (Iwashina 2000, Davies & Shwinn 2006).

Os flavonóides representam a classe de compostos fenólicos mais importantes e diversificados produzidos a partir da biossíntese dos fenilpropanóides, e apresentam as seguintes funções nas plantas: proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra patógenos, atração de animais para a polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (Dixon & Paiva 1995, Zuanazzi & Montanha 2001, Barp *et al.* 2006, Davies & Shwinn 2006). O metabolismo dos fenilpropanóides é induzido pelo aumento da incidência de raios UV, ataque de patógenos, diminuição de nitrogênio, fósforo e ferro no solo, variações na temperatura e injúrias, o que conseqüentemente aumenta a produção de flavonóides nas plantas submetidas a estes tipos de estresse (Dixon & Paiva 1995, Antognoni *et al.* 2007, Marinova *et al.* 2007).

Em *Passiflora*, os **flavonóides** encontrados são do tipo C-glicosilados, possuem atividade biológica e são de interesse quimiotaxonômico, sendo freqüentemente usados como marcadores na análise de medicamentos fitoterápicos (Iwashina 2000, Zuanazzi & Montanha 2001, Dhawan *et al.* 2004). Entre os flavonóides isolados mais comumente encontrados em *Passiflora*, destacam-se: apigenina, luteonina, quercetina, kaempferol, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (Oga *et al.* 1984, Dhawan *et al.* 2004), cujas estruturas são apresentadas no quadro 2.

Quadro 2. Estrutura química dos flavonóides descritos em *P. alata* e *P. edulis*.

Flavonóide	R8	R7	R6	R3	R
Apigenina	H	H	H	H	H
Luteonina	H	H	H	H	OH
Quercetina	H	H	H	OH	OH
Kaempferol	H	H	H	OH	H
Vitexina	C-glicosilado	H	H	H	H
Isovitexina	H	H	C-glicosilado	H	H
Orientina	C-glicosilado	H	H	H	OH
Isoorientina	H	H	C-glicosilado	H	OH

(adaptado de Dhawan *et al.* 2004)

Outras substâncias como terpenos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, esteróides, lignanas, ácidos graxos, maltol, aminoácidos e taninos são descritos como possíveis responsáveis pelos efeitos farmacológicos de algumas espécies de *Passiflora* (Rhaman *et al.* 1997; Dhawan *et al.* 2001a,b,c; 2004; Petry *et al.* 2001; Akhondzadeh & Maleki 2006; Bezerra *et al.* 2006; Castro *et al.* 2007).

Estudos de localização *in situ* de compostos bioativos ganham destaque por possibilitar relacionar as rotas biossintéticas às organelas, células e tecidos das plantas (Weissenböck & Sachs 1977, Deus-Neumann & Zenk 1984, DeLuca & Cutler 1987, Ehmke *et al.* 1988, Waldhauser & Baumann 1996, Zamski *et al.* 1996, St-Pierre *et al.* 1999, DeLuca & St-Pierre 2000, Pozuelo *et al.* 2001, Bird *et al.* 2003, Weid *et al.* 2004, Kutchan 2005, Otani *et al.* 2005, Wollenweber & Dörr 2008). Estes estudos são essenciais ao entendimento das causas do insucesso de induzir culturas de células para produzir

compostos bioativos presentes na planta como um todo, mesmo fornecendo os precursores às culturas (Fowler 1981). Alguns metabólitos, como os alcalóides, requerem diferenciação das células (citodiferenciação) ou organização de células em órgãos como raízes ou caule para sua síntese (Lindsey & Yeoman 1983). Um exemplo de insucesso é a pesquisa dos alcalóides indólicos monoterpênicos de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae) – vincristina e vinblastina – que possuem alto valor terapêutico como antitumorais, mas se apresentam em concentrações ínfimas na planta, o que eleva consideravelmente os custos dos medicamentos (St-Pierre *et al.* 1999, DeLuca & St-Pierre 2000, Bird *et al.* 2003, Mahroug *et al.* 2006). Técnicas de cultura de células tentaram, sem sucesso, obter os alcalóides fornecendo precursores às culturas. Posteriores estudos de histoquímica, imunolocalização e hibridização *in situ* revelaram a necessidade da presença de pelo menos dois tipos celulares e translocação intercelular de intermediários para a síntese de vindolina – precursor de vincristina e vinblastina – o que justificaria parcialmente as falhas na produção deste precursor por meio da tecnologia de cultura de células (St-Pierre *et al.* 1999, Mahroug *et al.* 2006).

Padrões de biossíntese que requerem diversos tipos celulares e a translocação de precursores até os locais de armazenamento de compostos bioativos como alcalóides, flavonóides e terpenóides são sugeridos para diversas plantas de valor econômico e farmacológico (DeLuca & St-Pierre 2000, Weid *et al.* 2004, Marinova *et al.* 2007). Até o momento, não há trabalhos que enfoquem a localização *in situ* dos possíveis sítios de síntese/translocação/armazenamento dos compostos bioativos descritos na literatura em *P. alata* e *P. edulis*. Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese e embriogênese *in vitro* foram realizados em *P. edulis* (Apezzato-da-Glória *et al.* 1999,

Fernando *et al.* 2007, Lombardi *et al.* 2007); no entanto, não há ênfase quanto à procura de células produtoras de compostos bioativos.

Estruturas secretoras em Passifloraceae

As obras clássicas de revisão apresentam as seguintes estruturas secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de espécies de Passifloraceae: nectários extraflorais (NEF), coléteres, células taníferas e/ou “sacos taníferos” (idioblastos), hidatódios, cavidades e tricomas (Solereeder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979; Fahn 1979; Thomas 1991).

Os **NEF** apresentam diversas definições e conceitos (cf. Schmid 1988), sendo mais simples e adequados aqueles que os consideram como estruturas secretoras de néctar não envolvidas diretamente com a polinização (Fahn 1979, Elias 1983, Koptur 1992, Machado 2002), presentes em estruturas vegetativas e reprodutivas (Fahn 1979, 2000; Durkee *et al.* 1981, 1984; Durkee 1982; Elias 1983; Rico-Gray *et al.* 2004). Os NEF são glândulas estruturalmente diversas que apresentam ou não vascularização (Zimmermann 1932; Bentley 1977; Durkee 1982, 1983a,b; Diaz-Castelazo *et al.* 2005). O néctar proveniente dos NEF contém uma alta proporção de açúcares (15-75% em peso seco) e possuem quantidades significantes de aminoácidos e baixas proporções de outros compostos orgânicos, em maior concentração comparados ao floema. Estas concentrações estão sujeitas às variações temporal, espacial e biótica (Kenoyer 1917; Baker *et al.* 1978; Durkee 1983a,b; Smith *et al.* 1990; Galetto & Bernardello 1992; Koptur 1992; Pascal 1993; Heil *et al.* 2000).

Em Angiospermas, a função ecológica dos NEF foi motivo de debates controversos no passado (Bentley 1977), entretanto evidências para a hipótese “protetora”, i.e., atração de insetos benéficos, é amplamente aceita (Bentley 1977, Koptur 1992, Labeyrie *et al.* 2001, Rudgers & Gardener 2004), embora esta função não seja aplicada a todos os NEF

(O'Dowd & Catchpole 1983, Pemberton & Lee 1996, Apple & Feener 2001, Wagner & Kay 2002, Blüthgen & Reifenrath 2003). Espécies de *Passiflora* possuem relações mutualistas entre os NEF e insetos, sendo alvo de estudos de relações ecológicas e evolutivas (Janzen 1968, Benson *et al.* 1975, McLain 1983, Buckley 1987, Belin-Depoux 1993, Heil & McKey 2003, Yockteng & Nadot 2004).

Em *Passiflora*, os NEF já foram relatados na região abaxial do pecíolo e nas margens das lâminas foliares (Roth 1969, 1974; Fahn 1979; Durkee 1982, 1983 a,b; Elias 1983; Durkee *et al.* 1984; Belin-Depoux 1989; Pascal 1993; García *et al.* 2000; Jáuregui *et al.* 2002; Kurtz *et al.* 2003; Farinazzo & Salimena 2007; Nicolson *et al.* 2007). Apesar da existência de relatos sobre NEF em diversas espécies de *Passiflora*, estudos interdisciplinares que legitimem a identificação destas glândulas como nectaríferas foram realizados em apenas algumas espécies (Janzen 1968, Durkee 1982, McLain 1983, Apple & Feener 2001, Wirth & Leal 2001). Esta verificação tornou-se necessária a partir do trabalho realizado em *P. foetida* por Durkee *et al.* (1984), em que estruturas antes descritas como NEF (Roth 1969) revelaram-se glândulas lipofílicas.

Os **coléteres** são estruturas que produzem uma secreção viscosa que protege os meristemas contra o dessecamento (Thomas 1991) e, às vezes, contra fitófagos (Demarco 2005, Castro & Demarco 2008). A secreção pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979) ou uma mistura de mucilagem, terpenos (Fahn 1990), ácidos graxos e compostos fenólicos (Demarco 2005, Castro & Demarco 2008). Estruturalmente, os coléteres podem ser tricomas ou emergências, sendo encontrados nos órgãos vegetativos de diversas famílias (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991). Em Passifloraceae, a única descrição de coléteres refere-se genericamente a tricomas posicionados na base da lâmina foliar em espécies de *Passiflora* (Solereder 1908, Thomas 1991).

Idioblastos secretores são células individualizadas cujo conteúdo vacuolar apresenta composição química distinta das células que a cercam; apresentam formato variável e são classificadas de acordo com os compostos presentes em seu interior (Solereider 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979; Fahn 1990; DeLuca & St-Pierre 2000; Evert 2006; Castro & Demarco 2008). Parte da síntese de precursores – p. ex. alcalóides indólicos – ou do armazenamento de compostos bioativos – p. ex. alcalóides tropânicos e nicotínicos pode ocorrer no vacúolo dos idioblastos secretores (St-Pierre *et al.* 1999, DeLuca & St-Pierre 2000, Bird *et al.* 2003, Weid *et al.* 2004, Mahroug *et al.* 2006). Diversas classes de compostos fenólicos são sintetizadas/acumuladas em um grande vacúolo central ou em numerosos glóbulos de vários tamanhos no citoplasma dos idioblastos (Weissenböck & Sachs 1977, Iwashina 2000, Marinova *et al.* 2007, Castro & Demarco 2008).

Relações ecológicas em *Passiflora*

A defesa das plantas ocorre por uma combinação de defesas constitutivas e induzidas, que reduz o desempenho dos herbívoros (Price *et al.* 1980, Karban & Baldwin 1997). A defesa constitutiva define-se pela expressão contínua de resistência, independente da presença ou ação de herbívoros (Price *et al.* 1980). A induzida é caracterizada pela expressão de resistência da planta somente após a injúria, atuando direta ou indiretamente sobre o folívoro (Thaler 1999). Entre as defesas constitutivas apresentadas por espécies de *Passiflora* destacam-se a presença de antocianinas – em que o estímulo para sua produção é a intensidade de luz solar – e adaptações morfológicas, como tricomas tectores e NEF. As defesas induzidas dividem-se em diretas, caracterizadas por incrementos em metabólitos secundários que afetam diretamente o herbívoro, ou indiretas, descritas como defesas bióticas (Thaler 1999). As defesas

indiretas incluem a atração de inimigos naturais de herbívoros mediante a liberação de voláteis (Ament *et al.* 2004) e aumento na liberação de compostos nutritivos – p. ex. néctar – que estimulam a associação mutualista de plantas com outros organismos (Coley *et al.* 1985).

O mutualismo é definido como qualquer interação na qual duas ou mais espécies se beneficiam mutuamente (Boucher *et al.* 1982, Addicott 1984). Esta troca de benefícios entre espécies pode resultar em uma relação facultativa ou na especialização e dependência mútua para ambas as partes, resultando em uma interação obrigatória (Boucher *et al.* 1982). Os principais coletores de néctar dos NEF são as formigas (Blüthgen *et al.* 2000). Geralmente, as relações mutualistas entre formigas e plantas são de natureza facultativa e não específica (Addicott 1984). O efeito protetor conferido às plantas inclui a redução da presença de herbívoros e predadores de sementes (Smiley 1978, 1986), e aumento do crescimento e sobrevivência das plantas (Kelly 1986). Este efeito protetor é relatado em *P. adenopoda* (Gilbert 1971), *P. coccinea* (Wirth & Leal 2001, Leal *et al.* 2006), *P. incarnata* (McLain 1983), *P. quadrangularis* e *P. vitifolia* (Smiley 1986).

Tradicionalmente, as substâncias químicas do chamado metabolismo secundário são consideradas as grandes responsáveis pela defesa de plantas, influenciando fortemente o padrão de utilização de recursos por insetos fitófagos (Fraenckel 1959). A teoria da coevolução, proposta por Ehrlich e Raven (1964), sugere que substâncias do metabolismo secundário são as maiores responsáveis pela coevolução entre insetos fitófagos especialistas e suas plantas hospedeiras. Os autores se baseiam no fato destes insetos apenas consumirem grupos de plantas que produzem a mesma classe de metabólitos secundários e de serem capazes de detoxicar essas substâncias, muitas vezes seqüestrando-as para defesa contra seus inimigos naturais.

Borboletas da tribo Heliconiini (Nymphalidae) são reconhecidas ecologicamente pelas relações coevolutivas que estabelecem com espécies de *Passiflora* (Benson *et al.* 1975, Gilbert 1975, Copp & Davenport 1978, Brown 1981). As larvas destas borboletas se alimentam exclusivamente de indivíduos deste gênero, sendo referidas como “borboletas de passiflora” (Coop & Davenport 1978). Pesquisas desta interação sugerem que muitos aspectos comportamentais e sistemas sensoriais de Heliconiini evoluíram no contexto da exploração de *Passiflora* como recurso alimentar para a larva das borboletas; em contrapartida, as plantas desenvolvem estratégias químicas e morfológicas de defesa contra a predação por estes insetos (Benson *et al.* 1975, Gilbert 1975, Copp & Davenport 1978). Os compostos químicos presentes em *Passiflora* provavelmente evoluíram como dissuasivos de borboletas; entretanto, estes insetos desenvolveram formas de detoxicar e incorporar estas substâncias, usados por larvas e adultos como proteção contra seus predadores e até na síntese de feromônios (Benson *et al.* 1975).

Ainda segundo a teoria da coevolução (Ehrlich & Raven 1964), a sucessão de defesas químicas contra herbívoros é produzida de forma gradual pela espécie hospedeira: a cada etapa, alguns herbívoros se tornam extintos, enquanto outros contornam o desafio químico, levando a planta a desenvolver novos compostos dissuasivos. Situações em que um grupo restrito de insetos é relevante para o vegetal – como borboletas Heliconiini e *Passiflora* –, este desenvolve atributos morfológicos que são mais vantajosos em termos de custos: as defesas morfológicas não apresentam custos adicionais como a autotoxicidade, em que a solução requer muita energia da planta cada vez que novas defesas químicas são desenvolvidas.

A seleção natural atua fortemente sobre características que reduzem as taxas de herbivoria das plantas, favorecendo estruturas que atraem predadores de herbívoros para

as plantas, ou que produzem compostos químicos nocivos aos herbívoros (Smiley 1986). Neste contexto, a elucidação das estruturas secretoras envolvidas nas interações inseto-planta é essencial para o entendimento das relações ecológicas e evolutivas que concernem *Passiflora* e as borboletas Heliconiini. O estudo das estruturas secretoras baseia-se em um tripé constituído por investigações acerca da **estrutura** da glândula, cujos resultados são fornecidos por observações morfológicas e anatômicas; do **exsudato** por elas produzido, avaliado por meio de análises histoquímicas que detectam as principais classes de compostos *in situ*, e químicas que identificam as substâncias efetivamente disponibilizadas pela planta; e da **função**, atribuída à glândula somente quando a estrutura e o exsudato são definidos e com base no contexto ecológico/evolutivo sob o qual a planta está submetida. O grupo de pesquisa em estruturas secretoras (IB/UNICAMP) inova ao apresentar o primeiro estudo em que as técnicas que integram os três pilares fundamentais acima mencionados são utilizadas.

Objetivo geral

O presente trabalho tem o propósito de caracterizar a morfologia e anatomia das estruturas secretoras presentes nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims, com ênfase na localização *in situ* dos compostos bioativos.

Passiflora alata Curtis e *P. edulis* Sims são espécies bem posicionadas taxonomicamente (Müschner *et al.* 2003, Yockteng & Nadot 2004) e não possuem problemas quanto à sua identificação (Killip 1938, Bernacci *et al.* 2003).

Os aspectos morfológicos dos indivíduos sombreados e expostos ao sol de ambas as espécies são apresentados com base nas observações das plantas cultivadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA; Paulínia, SP), pertencente à UNICAMP, e em literatura (Bernacci *et al.* 2003): *P. alata* (figura 1) é

uma liana robusta, glabra, de caule quadrangular; possui folhas simples (figura 1, *inset*) com um par de estípulas falciformes (figura 2) e o pecíolo exibe duas a quatro glândulas de formato estipitado-crateriforme, em número variável no mesmo indivíduo (figuras 3-6). A margem foliar é inteira a denteada.

P. edulis é uma trepadeira glabra a pubescente, com ramos subcilíndricos e estípulas triangulares-subuladas pouco conspícuas; a lâmina foliar é simples e trilobada (figura 7, *inset*), cujos lobos são oval-elípticos, serreados e glandulares (figura 8); o pecíolo apresenta um par de glândulas côncavas (figura 8, *inset*). Quando presentes, os tricomas tectores são observados nas regiões costais e margens da lâmina foliar (figuras 9 e 10).

As antocianinas acumulam-se nos indivíduos expostos ao sol: em *P. alata*, restringem-se às alas do caule (figura 2), enquanto estão amplamente distribuídas no ápice caulinar vegetativo e primeiros nós visíveis de *P. edulis*, inclusive nas glândulas peciolares (figura 8, *inset*). Em ambas as espécies, os nós subseqüentes ao ápice caulinar vegetativo, sombreados por outros ramos, e indivíduos sombreados não apresentam antocianinas (figuras 3,5).

Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de açúcares no exsudato das glândulas foliares e efetuar registros fotográficos dos eventuais coletores;
- Realizar um estudo morfológico e ontogenético com o escopo de verificar a origem e estrutura das glândulas foliares;
- Verificar a natureza química do material sintetizado pelas glândulas foliares através de testes histoquímicos convencionais;

- Identificar compostos químicos de massas conhecidas – açúcares e compostos bioativos – no exsudato produzido pelas glândulas foliares;
- Analisar a micromorfologia e identificar os átomos constituintes dos cristais presentes nas glândulas peciolares;
- Detectar os possíveis locais de translocação/armazenamento dos compostos bioativos (alcalóides e flavonóides) através de testes com reagentes específicos.

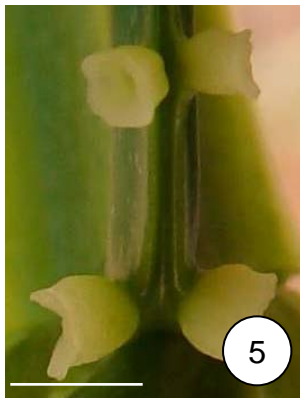
Os objetivos específicos são abordados em três capítulos distintos e conjuntamente avaliados na discussão geral e considerações finais:

Capítulo 1: Morfologia e ontogênese dos nectários extraflorais peciolares de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae);

Capítulo 2: Caracterização morfológica e estrutural das glândulas foliares marginais em *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae);

Capítulo 3: Localização *in situ* dos compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae).

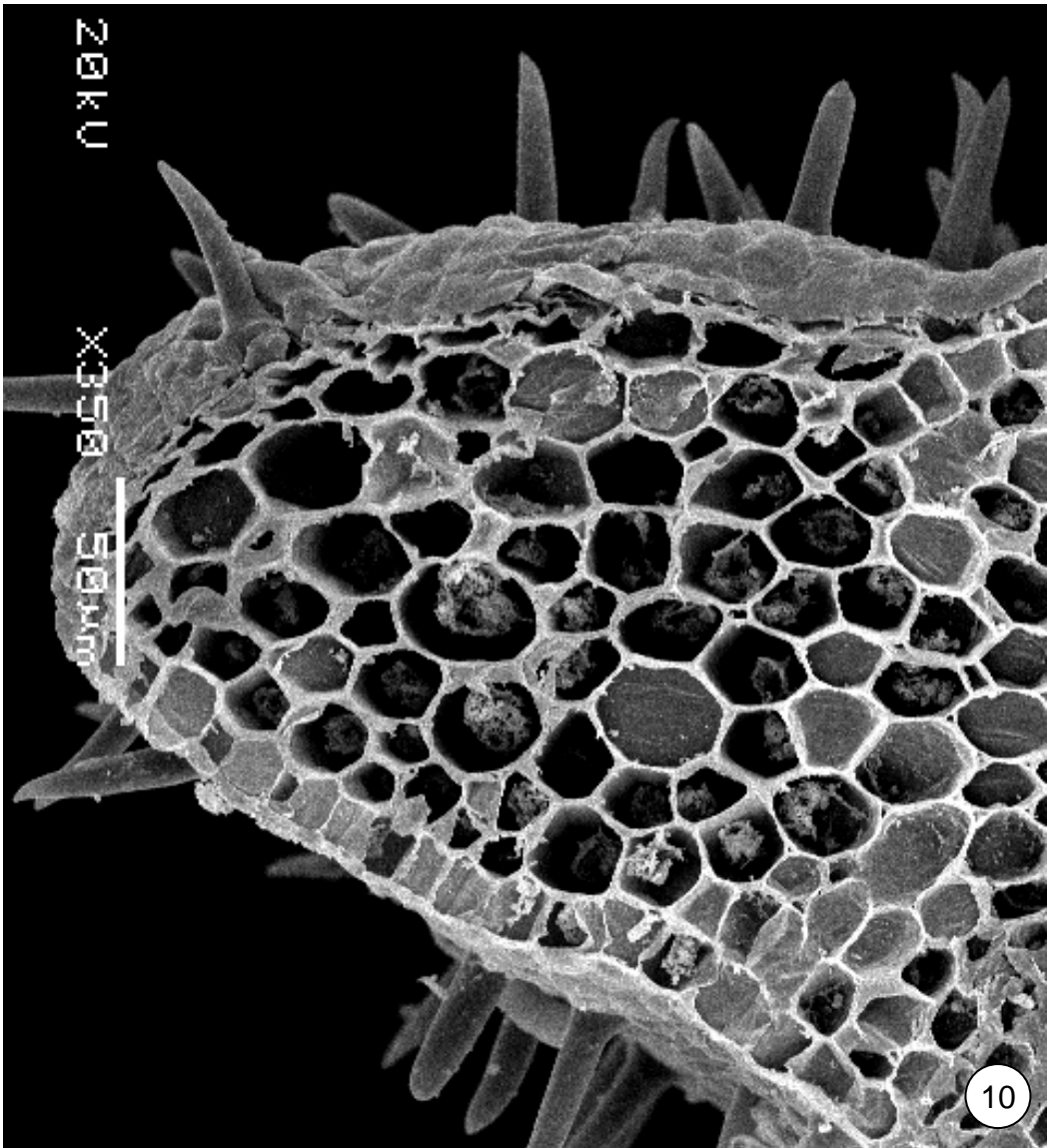
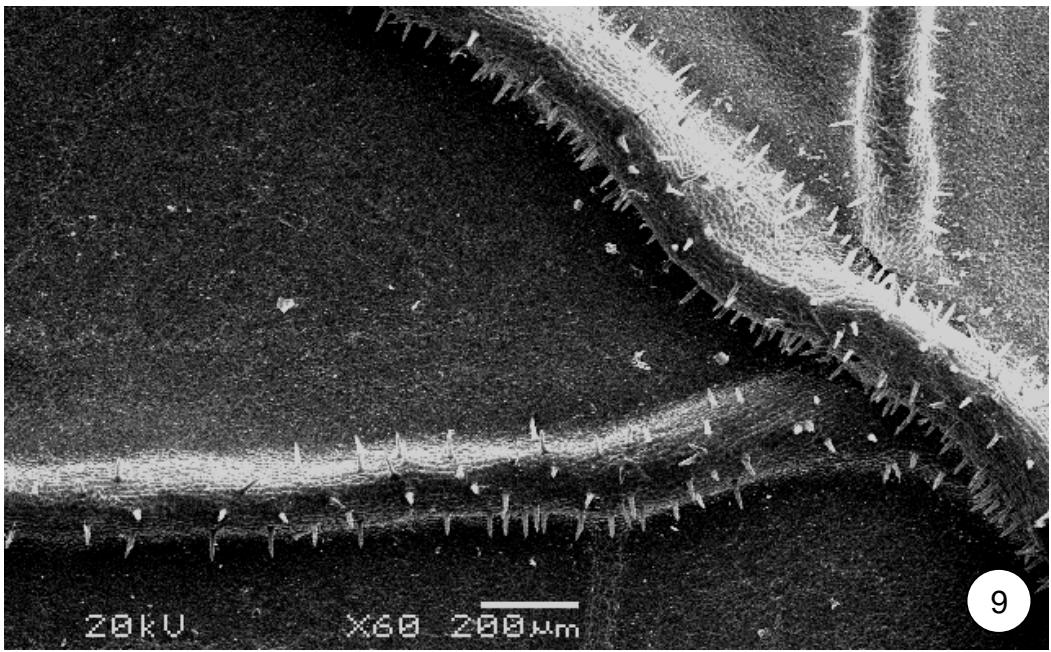
Figuras 1-6. Indivíduos de *Passiflora alata* Curtis cultivados no CPQBA (Paulínia, SP). 1,2,4. Indivíduos expostos ao sol. 3,5. Indivíduos sombreados. 1. Órgãos vegetativos aéreos; folha do sétimo nó visível (seta); folhas simples e inteiras (*inset*). 2. Antocianinas restritas às alas do caule. 3-6. Glândulas peciolares. 3. Um par de glândulas no terceiro nó visível. 4. Três glândulas no quarto nó. 5. Dois pares no quinto nó. 6. Número variável de glândulas em um mesmo indivíduo. Barras: 10cm (1), 1cm (2-6).



Figuras 7-8. Indivíduos de *Passiflora edulis* Sims cultivados no CPQBA (Paulínia, SP). 7. Folhas simples e trilobadas (*inset*). 8. Indivíduo exposto ao sol: antocianinas nos órgãos jovens e nas glândulas peciolares (*inset*). Barras: 10cm (7), 1cm (8).



Figuras 9-10. Distribuição dos tricomas tectores na lâmina foliar de *Passiflora edulis* Sims em MEV. 9. Tricomas nas nervuras foliares; face abaxial. 10. Tricomas nas margens foliares; secção transversal.



CAPÍTULO 1

Morfologia e ontogênese¹ dos nectários extraflorais peciolares de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae)

Introdução

Passiflora L. apresenta espécies de grande complexidade estrutural vegetativa, resultado dos avanços evolutivos desenvolvidos a partir de relações coevolutivas com seus herbívoros primários, as borboletas da tribo Heliconiini (Benson *et al.* 1975, Brown 1981, Spencer 1988). Lagartas de espécies de *Agraulis*, *Dione*, *Eueides* e *Heliconius* podem desfolhar rapidamente as plantas hospedeiras e representam o maior desafio biótico para a sobrevivência de indivíduos de *Passiflora* nos trópicos (Benson *et al.* 1975, Gilbert & Smiley 1978, Brown 1981). Os representantes deste gênero possuem diversas estratégias de defesa, nas quais destacam-se as inovações morfológicas – tricomas de ápice agudo, morfologia foliar variável, estruturas mímicas – como resposta evolutiva às lagartas herbívoras (Spencer 1988), visto que as alterações que promovem no comportamento do herbívoro apresentam maior influência sobre o curso da evolução do que a presença de compostos químicos defensivos (Benson 1978).

A seleção visual condicionou muitas diversificações da morfologia foliar entre *Passiflora* e outras *taxa* de plantas tropicais (Gilbert 1971). Experimentos comportamentais demonstram que as borboletas do gênero *Heliconius* apresentam visão de cores como possível resposta à seleção para a habilidade discriminativa dos sítios de oviposição pelas fêmeas (Crane 1955, 1957; Swihart 1971; Struwe 1972; Kelber *et al.* 2003), apesar dos

¹ Desenvolvimento de um organismo, órgão, tecido ou célula desde a concepção até a maturidade (Evert 2006).

estímulos químicos não serem excluídos (Williams & Gilbert 1981). Entre as estratégias apresentadas por espécies de *Passiflora* destacam-se os ovos mímicos – *egg mimics* –, estruturas derivadas de diversos tecidos que desencorajam a oviposição de borboletas que possuem lagartas solitárias e agressivas (Gilbert 1975). Evidências do surgimento independente destas estruturas em diversas espécies são indicadas pela importância dos heliconídeos como consumidores de *Passiflora*, pelo comportamento canibalista das lagartas ao se alimentarem de ovos e indivíduos da mesma espécie, e ao cuidado apresentado pelas fêmeas em inspecionar os sítios de oviposição (Gilbert 1975, Williams & Gilbert 1981).

Glândulas peciolares são características de Passifloraceae (Killip 1938, Bernacci *et al.* 2003) e geralmente descritas como nectários extraflorais (NEF) sem que estudos que legitimem sua identificação sejam realizados. Esta generalização é equivocada, visto que glândulas nesta mesma posição podem ser lipofílicas e secretar compostos dissuasivos, como em *P. foetida* (Durkee 1982).

Os NEF são um tipo de defesa biótica em que as glândulas presentes em diversos órgãos vegetativos ou reprodutivos – não ligados à polinização – oferecem néctar às formigas que apresentam comportamento agressivo, estabelecendo relações mutualistas (Addicott 1984). Em *Passiflora*, estudos interdisciplinares que legitimem a identificação de glândulas peciolares como nectaríferas foram realizados em poucas espécies (Janzen 1968, Durkee 1982, McLain 1983, Apple & Feener 2001, Wirth & Leal 2001), ressaltando-se a necessidade da investigação e identificação correta destas glândulas.

O néctar é uma solução em que os solutos dominantes são açúcares (Fahn 1979) – glicose, frutose e sacarose – e outros compostos, incluindo metabólitos secundários, em menor concentração relativa (Fahn 2000, Nicolson *et al.* 2007). A variação na composição do néctar normalmente observada entre diferentes espécies pode ser explicada por duas

hipóteses não mutuamente exclusivas: (i) o processo secretor nos nectários controla a composição química; ou (ii) os constituintes do néctar refletem a composição química do floema (Adler 2001). Compostos secundários incluindo alcalóides, compostos fenólicos, glicosídeos iridóides, glicosinolatos e cardenolidas eventualmente estão presentes em baixa concentração na solução nectarífera e são transportados entre os tecidos da planta via floema, a partir do qual alguns são transferidos diretamente ao néctar, enquanto outros são retidos (Fahn 1979, Kuo & Pate 1985, Adler 2001). A presença de compostos do metabolismo secundário no néctar é bem documentada em nectários florais, em detrimento aos NEF (Baker & Baker 1975, Baker *et al.* 1978b, Stephenson 1982, Smith *et al.* 1990, Adler 2001, Varassin *et al.* 2001, Adler & Irwin 2005, Nicolson *et al.* 2007). Em *Passiflora*, o relato destes compostos no exsudato proveniente dos NEF é ainda inexistente.

Diante da importância das glândulas peciolares nas defesas constitutivas e adaptativas que se estabelecem entre *Passiflora* e as borboletas Heliconiini, a identificação destas estruturas em *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims proverá dados que poderão auxiliar na compreensão das relações co-evolutivas desenvolvidas por estes organismos.

Objetivos

O presente estudo tem o propósito de caracterizar a morfologia e estrutura das glândulas peciolares de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims.

Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de açúcares no exsudato pelo uso de tiras de identificação de glicose (glicofita) e efetuar registros fotográficos dos eventuais coletores;

- Realizar um estudo morfológico e ontogenético com o escopo de verificar a origem, estrutura e função destas glândulas;
- Verificar a natureza química do material sintetizado pelas glândulas através de testes histoquímicos convencionais;
- Identificar compostos químicos de massas conhecidas – açúcares e compostos bioativos – no exsudato produzido pelas glândulas;
- Analisar a micromorfologia e identificar os átomos constituintes dos cristais presentes nestas glândulas.

Materiais e Métodos

Em campo

Indivíduos de *P. alata* e *P. edulis* foram coletados pela manhã no CPQBA (Paulínia, SP), disponibilizados pelo Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães, e identificados pelo especialista Dr. Luis Bernacci do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O material testemunha de cada espécie foi providenciado e incluído no Herbário UEC. Dados referentes ao material testemunha são apresentados a seguir: *P. alata* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 25-VII-2009, *P.R. Cardoso* 3 (UEC 145620); *P. edulis* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 24-XI-2008, *P.R. Cardoso* 2 (UEC 111509). Ressalta-se que ambas as espécies são cultivadas sob as mesmas condições.

Os aspectos morfológicos da ontogênese das glândulas peciolares foram registrados de dois indivíduos sombreados e dois expostos à luz solar de cada espécie. As bases dos ramos vegetativos foram isoladas com graxa inócua “Tanglefoot” (figura 1) para evitar a remoção do exsudato pela fauna associada; na manhã seguinte ao isolamento dos ramos,

as glândulas cuja secreção era profusa foram testadas com glicofita (figura 2) (Keeler & Kaul 1979, Dias 2008) e o exsudato coletado para análises químicas posteriores.

Observações e registros fotográficos foram realizados no período da manhã para verificar se o exsudato produzido pelas glândulas peciolares provia recursos à fauna associada. Fotos de formigas foram enviadas ao Prof. Dr. Carlos Roberto Brandão (Museu de Zoologia, USP) e das abelhas à Profa. Dra. Marlies Sazima (Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp) para identificação. Os aspectos morfológicos das glândulas peciolares foram registrados em dois indivíduos sombreados e dois expostos à luz solar de cada espécie. O registro fotográfico dos aspectos relevantes foi obtido com a câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-H1 e as imagens (600dpi) editadas no programa Photoshop 7.0 para elaboração das pranchas.

O critério adotado na seleção do número de nós para o acompanhamento da ontogênese foi o ápice caulinar e folhas dos sete nós subseqüentes em ambas as espécies, visto que a partir do sexto nó visível as lâminas foliares podem ser encontradas em total expansão.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (EDS)²

Peças fixadas em FAA (Johansen 1940) e Karnovsky (Kraus & Arduin 1997) de um indivíduo de cada espécie foram isoladas, desidratadas em série etílica ascendente, secas pelo método de ponto crítico e metalizadas com ouro coloidal (Ascensão *et al.* 1999, modificado).

² A incidência do feixe de elétrons sobre um mineral provoca a excitação dos elétrons mais externos dos átomos ou íons constituintes, promovendo mudanças nos níveis energéticos; o retorno dos elétrons à posição inicial libera a energia adquirida, emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. O detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron, correspondente a um átomo ou íon distinto, identificando os elementos constituintes da amostra (Goldstein *et al.* 1994).

A microanálise dos cristais foi realizada em secções longitudinais dos nectários peciolares em fase secretora de ambas as espécies. O material foi fixado, desidratado e seco conforme as técnicas supramencionadas, e metalizado com ouro ou cobertos com carbono (Rio *et al.* 2008).

A metalização do material botânico com ouro coloidal para visualização em MEV requer uma camada espessa deste metal (200s) devido à sensibilidade do material botânico aos feixes de elétrons e ao espalhamento de elétrons promovido pela clorofila. Entretanto, para o estudo em EDS, a metalização com ouro introduz artefatos no espectro, ao promover o surgimento de picos correspondentes a este metal. Recomenda-se a metalização com carbono para estudos de cristais em EDS, pois esta técnica não introduz artefatos e facilita a localização dos cristais (Razzo, comunicação pessoal).

As observações, microanálises e captura de imagens (600dpi) foram procedidas em microscópio JEOL JSM 5000LV 6350 acoplado ao espectrômetro por energia dispersiva de raios-x a 20kV, do Instituto de Química/Unicamp, e as imagens editadas no programa Photoshop 7.0.

Estudos estruturais e histoquímicos

Ramos vegetativos aéreos de dois indivíduos de cada espécie foram fixados em FAA (Johansen 1940) por 24h para preservar compostos hidrofílicos; em formalina neutra tamponada (FNT; Lillie 1965) por 48h para os compostos lipofílicos; e em sulfato ferroso em formalina (SFF; Johansen 1940) por 48h para a localização *in situ* de compostos fenólicos totais (Castro & Demarco 2008).

Glândulas peciolares foram isoladas; o material foi desidratado em série butílica ascendente (álcool butílico terciário, Johansen 1940) e incluído em parafina. Os cortes seriados obtidos foram corados com safranina e azul de astra (Gerlach 1969) e tripla

coloração de Flemming (Johansen 1940) para estudos estruturais, e as lâminas montadas em resina sintética. A observação de cristais foi realizada sob luz polarizada.

Testes histoquímicos³ foram aplicados em material fresco e fixado proveniente de um indivíduo de cada espécie. Os ensaios foram procedidos nas glândulas em fase secretora para a localização *in situ* das principais classes de compostos químicos que constituem a secreção: grupos 1,2-glicol presentes em polissacarídeos totais (McManus 1948, Jensen 1962), compostos alifáticos (Pearse 1985), terpenóides (David & Carde 1964), compostos fenólicos totais (Johansen 1940, Castro & Demarco 2008), flavonóides (Charrière-Ladreix 1976, Wollenweber 1982, Tattini *et al.* 2000) e aminas terciárias e quaternárias presentes em alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Svedsen & Verpoorte 1983). Os tratamentos estão citados na tabela 1.

O controle dos testes hidrofílicos foi procedido de acordo com as respectivas técnicas; aos testes lipofílicos foi realizada a extração prévia dos compostos lipofílicos pela solução clorofórmio/metanol/água/ácido clorídrico (66:33:4:1 v/v; High 1984) e posterior fixação em FNT (Lillie 1965). O controle dos testes para detecção de alcalóides foi efetuado pelo tratamento prévio das peças com ácido tartárico 5% (Svedsen & Verpoorte 1983). Secções a mão livre foram realizadas em indivíduos expostos ao sol e sombreados para a localização *in situ* de antocianinas. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Observações sob fluorescência na banda do ultravioleta (UV) foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 equipado com lâmpada de mercúrio (HBO 100W) e filtro bloqueador BA420 (filtro de excitação BP330-385 e espelho dicromático DM400).

³ A sensibilidade dos testes histoquímicos é da ordem de 1-10µg; compostos cuja concentração se apresenta em traços não são detectados (Goodwin 1976).

Os aspectos relevantes foram registrados através de imagens (600dpi) obtidas na câmera digital DP71 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX51 e em filme Pro Image Kodak 100, e os negativos digitalizados. As escalas foram obtidas pela projeção da lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas. As imagens foram editadas no programa Photoshop 7.0 para a elaboração das pranchas.

Análise química do exsudato – espectrometria de massas (MS)⁴

O exsudato proveniente de diferentes glândulas de ambas as espécies foi coletado com microcapilares, agrupados e armazenados em tubos *ependorff* a -10°C (Thadeo *et al.* 2008).

A análise das amostras foi realizada em triplicata. A alíquota de 10µl do exsudato foi solubilizada na concentração de 50µg/ml em água: metanol (7:3, v:v) contendo 5mmol/l de cloreto de sódio ou potássio (Souza 2008).

As amostras foram aplicadas por injeção direta em dois equipamentos distintos: os espectros 70, 72 e 73 foram obtidos no espectrômetro de massas Q-TOF Micromass Waters; o espectro 71 no espectrômetro de massas Thermofischer Scientific High Resolution Mass Spectrometer 7.2 Tesla, FT-LQT-MS Ultra. As condições de análises foram as mesmas em ambos os espectrômetros: temperatura de dessolvatação a 100°C, em que o nitrogênio foi usado como gás de nebulização e dessolvatação; capilar de 3000V; cone de 40V. A detecção foi feita em modo positivo e negativo⁵ de ionização em

⁴ A espectrometria de massas é um método analítico de identificação dos diferentes átomos e moléculas que compõem uma substância. A amostra inserida no espectrômetro de massas é bombardeada com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados, que atravessam um campo magnético curvando distintamente suas trajetórias, de acordo com suas massas molares. O campo separa os íons e átomos eletricamente carregados em um padrão chamado espectro de massa, em que a massa e a carga dos íons podem ser medidas e identificadas por sua posição no espectro (Gross 2004).

⁵ O espectro no modo positivo detecta os íons protonados (com cargas positivas); no modo negativo, as espécies desprotonados (cargas negativas) (Gross 2004).

pressão atmosférica. As análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo; a aquisição e processamento dos espectros foram realizados com o *software* Excalibur 2.0 SR1™.

O processamento e análise das amostras foram realizados no laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, no Instituto de Química/Unicamp, sob a supervisão e auxílio da Dra. Alexandra C.H.F. Sawaya e Msc. Nathalia Luiza Andreazza.

Resultados

Dados macromorfológicos e observações de campo (figuras 1-18)

O exsudato profuso é registrado apenas nos indivíduos cuja base dos ramos foi isolada com graxa inócua para evitar o acesso das formigas às glândulas peciolares (figura 1). A presença de glicose no exsudato é evidenciada pelo uso da glicofita (figura 2) em indivíduos de ambas as espécies já a partir do primeiro nó visível.

Os NEF em fase secretora possuem morfologia distinta. *P. alata* apresenta duas a quatro glândulas de formato estipitado-crateriforme, com 1-2mm de altura e coloração amarela (figuras 3-9). Os NEF são assíncronos em seu desenvolvimento – e, conseqüentemente, na liberação de néctar –, ocorrendo primeiro nas glândulas próximas ao caule (glândulas inferiores, figura 3). O néctar acumula-se na região crateriforme do nectário e é exposto no ápice da glândula localizada na porção superior do pecíolo (glândula superior; figura 4), a partir do segundo nó visível. A distinção morfológica entre as diferentes fases de desenvolvimento dos NEF é evidente nos primeiros nós visíveis: no par de glândulas do segundo nó é observada a morfologia convexa, característica da fase pré-secretora (figura 3), e estipitado-crateriforme no par inferior, própria da fase secretora (figuras 3,4). A visualização morfológica das fases de desenvolvimento dos NEF é dificultada nos nós subseqüentes, em que as glândulas em um mesmo pecíolo parecem

sincronizadas, e volta a ser notável a partir do sexto nó, em que a fase pós-secretora já pode ser constatada nas glândulas inferiores (figura 5).

Os indivíduos de *P. edulis* expostos ao sol apresentam antocianinas na epiderme de órgãos jovens e são menos consumidos quando comparados aos indivíduos sombreados. Esta espécie apresenta um par de NEF na base da lâmina foliar (figuras 10-15). As glândulas possuem formato convexo, com 1-1,5mm de altura e coloração verde em indivíduos sombreados (figuras 10,12,13) e avermelhada nos expostos ao sol (figuras 11,14,15). O desenvolvimento dos NEF é sincrônico (figuras 12,14) e o néctar deposita-se sobre a superfície da glândula (figuras 13,15). A morfologia côncava, característica da fase secretora, é observada a partir do segundo nó visível. A fase pós-secretora de néctar pode ocorrer nos NEF a partir do quinto nó (figura 16).

Formigas do gênero *Crematogaster* são observadas coletando o néctar de ambas as espécies (figuras 6,7,17,18) e, eventualmente, promovem injúrias na epiderme secretora dos NEF de *P. edulis*. Em *P. alata*, abelhas operárias “jataí” – *Tetragonisca angustula* (Latreille 1811) – também coletam o néctar (figuras 8,9).

Dados micromorfológicos e ontogenéticos (figuras 19-57)

Ontogênese dos NEF peciolares em MEV (figuras 19-31)

A fase meristemática dos NEF é evidenciada pelo surgimento de protuberâncias na base do primórdio foliar, um a dois pares em *P. alata* e um par em *P. edulis* (figuras 19-21,27), que aumentam em volume até adquirir formato aplainado (figuras 21,28), indicativo do início da fase pré-secretora. Em *P. alata*, a fase pré-secretora é caracterizada pelo alongamento da porção periférica do NEF, denotando o formato estipitado-crateriforme da glândula (figuras 22-24); em *P. edulis*, o NEF aumenta em volume, tornando-se convexo.

Em ambas as espécies, a fase secretora é identificada pela distensão da cutícula na região central do NEF (figuras 25,29-31). Inicialmente, observam-se pequenas elevações na porção central da glândula (figuras 25,29), que se sobressaem formando regiões abauladas (figura 30). A formação do espaço subcuticular decorrente da distensão da cutícula é evidenciada na secção transversal da glândula (figura 31).

A fase pós-secretora em ambas as espécies é caracterizada pela colonização de fungos na região secretora e pelo aplainamento da região periférica dos NEF de *P. alata* (figura 26).

Ontogênese dos NEF peciolares em microscopia óptica (32-57)

A formação dos NEF envolve a atividade dos três meristemas primários. No início do desenvolvimento, divisões celulares periclinais e anticlinais na protoderme e em diversos planos no meristema fundamental originam uma protuberância na base do primórdio foliar (figuras 32,34,47). As glândulas recebem um cordão procambial do primórdio foliar que se ramifica em direção ao centro da glândula (figuras 33,37,38,46).

As células da protoderme começam a se diferenciar radialmente, do centro para a periferia do nectário, passando por divisões periclinais que culminam com a formação da epiderme múltipla em paliçada (figuras 34,47), enquanto células da protoderme de posição periférica continuam a se dividir anticlinalmente. A visualização de cristais já ocorre a partir desta fase (figuras 35,36).

A assincronia no desenvolvimento dos nectários é evidenciada na figura 37: o NEF inferior está no final da fase pré-secretora e o superior no final da fase meristemática.

Fase pré-secretora

Em ambas as espécies, a região central do nectário apresenta epiderme múltipla, composta por até três camadas de células em paliçada; a região periférica da glândula possui uma camada de células pavimentosas (figuras 38,48,49).

A fase pré-secretora de *P. alata* caracteriza-se pela presença de dois tipos distintos de células parenquimáticas que se diferenciam a partir do meristema fundamental: células do parênquima nectarífero – menores, com núcleo periférico, nucléolo evidente, vacúolos distintos e citoplasma denso – e, limitadas pelos feixes vasculares em diferenciação, células do parênquima subnectarífero – composto por células parenquimáticas comuns. O formato estipitado-crateriforme deve-se à proliferação das células parenquimáticas comuns na região sob os tecidos nectaríferos e periférica da glândula (figura 38).

Em *P. edulis* a distinção entre o parênquima nectarífero e subnectarífero não é facilmente visualizada, sendo ambos limitados pelas terminações vasculares. As células do parênquima nectarífero aumentam em número e volume, promovendo o formato convexo (figuras 48,49).

Todos os tecidos estão diferenciados ao final da fase pré-secretora em ambas as espécies.

Fase secretora

Esta fase é determinada pela distensão da cutícula em ambas as espécies (figuras 39,52). Os fixadores preservam diferencialmente os compostos hidrofílicos: o pré-néctar⁶ é preservado nas glândulas fixadas em FAA dos indivíduos de ambas as espécies (figuras 39,50,51).

⁶ A solução resultante da modificação do conteúdo do floema pelos tecidos nectaríferos é denominada pré-néctar (Fahn 1979, Vassilyev 2010).

Epiderme – apresenta uma fina cutícula e flanges⁷ que se estendem até a parede periclinal interna da primeira camada celular (figura 54). Estas células são polinucleadas, núcleos em posição central ou basal, com conteúdo denso e inúmeras vesículas (figuras 40,41,53,54). O néctar produzido é confinado ao espaço subcuticular, situado entre a cutícula e a parede periclinal externa das células epidérmicas; a liberação do néctar pela epiderme nectarífera promove distensão cuticular (figuras 39,52). Estômatos e rompimento de cutícula não são observados. Em alguns nectários processados de *P. edulis*, observou-se ruptura da cutícula na região secretora após a coleta do néctar por formigas.

A epiderme nectarífera múltipla é constituída por células em paliçada que possuem numerosos vacúolos ou um grande vacúolo com conteúdo denso ou granuloso. Em *P. alata*, o conteúdo vacuolar possui alta afinidade pelo corante violeta cristal (figuras 40,41); em *P. edulis*, o conteúdo vacuolar apresenta baixa afinidade pela safranina, sendo observado o contorno de vacúolos – um grande ou pequenos e numerosos (figuras 53,54). Tecido secretor e fundamental – o parênquima nectarífero de *P. alata* é composto por uma a cinco camadas distintas das células do parênquima não-secretor e separadas destas pelas terminações vasculares (figura 39). As células do parênquima nectarífero apresentam paredes finas, núcleo proeminente, citoplasma menos denso que as células epidérmicas nectaríferas e são mais volumosas; estas células aumentam em volume próximo às terminações de floema. Idioblastos secretores são visualizados nas terminações vasculares e dispersos no parênquima nectarífero (figuras 39,44). O parênquima subnectarífero possui grãos de amido evidenciados sob luz polarizada (figuras 42,43). O parênquima nectarífero de *P. edulis* possui três a dez camadas de células muito semelhantes ao parênquima subnectarífero, distintos pela presença das terminações

⁷ Espessamentos irregulares coextensivos aos contornos laterais das paredes anticlinais das células epidérmicas (Miller 1985).

vasculares entre estes dois tecidos (figuras 49-51). Idioblastos secretores e grãos de amido não são observados. Em ambas as espécies, os cristais estão distribuídos por todo o nectário, próximos aos feixes vasculares (figuras 39,55,56).

Tecido vascular – o feixe vascular principal provém do pecíolo e se ramifica na base do nectário. As terminações vasculares consistem apenas de floema, contíguo ao parênquima nectarífero (figuras 39,44,50-52). Contato entre o floema e a epiderme nectarífera não é observado.

A fase pós-secretora é evidenciada pela presença de hifas de fungos em *P. alata* e a perda da integridade da epiderme de ambas as espécies (figuras 45,57).

Histoquímica dos NEF em fase secretora (figuras 58-69)

Os resultados da localização *in situ* dos compostos químicos presentes nas células dos NEF peciolares de ambas as espécies estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos realizados nos nectários peciolares de *P. alata* e *P. edulis*.

Tratamentos (referências)	Compostos identificados	Cor (resultado positivo)	Nectários peciolares	
			<i>P. alata</i> (figuras)	<i>P. edulis</i> (figuras)
reação PAS (McManus 1948, Jensen 1962)	grupos 1,2- glicol presentes em polissacarídeos totais	magenta	+ epiderme e parênquima nectaríferos (58)	+ epiderme e parênquima nectaríferos (66)
preto de Sudão B (Pearse 1985)	compostos alifáticos	azul a preto	+ cutícula e flanges cuticulares, epiderme e parênquima nectaríferos, idioblastos (59)	+ cutícula e flanges cuticulares (68)
reação PAS / preto de Sudão B (Pearse 1985)	grupos 1,2- glicol/ compostos alifáticos	magenta/azul a preto	+ epiderme e parênquima nectaríferos/ cutícula (60)	+ epiderme e parênquima nectaríferos/ cutícula (67)
reagente de Nadi (David & Carde 1964)	terpenóides	vinho, azul e lilás	+ epiderme e parênquima nectaríferos, idioblastos (61)	-
SFF* (Johansen 1940)	compostos fenólicos totais	marrom a preto	+ epiderme nectarífera e idioblastos (62)	+ epiderme e parênquima nectaríferos (69)
reagente natural A (Charrière-Ladreix 1976, Wollenweber 1982, Tattini <i>et al.</i> 2000)	flavonóides	amarelo esverdeado em UV**	+ epiderme e parênquima nectaríferos (63)	-
reagente de Dragendorff (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Svedsen & Verpoorte 1983)	aminas terciárias e quaternárias presentes em alcalóides	marrom avermelhado	+ epiderme e parênquima nectaríferos, idioblastos (64)	-

Notas: * fixador; ** 350-390nm; +, resultado positivo; -, resultado negativo.

Em ambas as espécies, os testes com preto de Sudão B evidenciam os flanges cuticulares que em algumas regiões se estendem até a parede periclinal interna da primeira camada de células epidérmicas em paliçada (figura 59,68); os testes com a

reação PAS e preto de Sudão B revelam o acúmulo de exsudato no espaço subcuticular formado entre a parede periclinal externa e a cutícula (figura 67).

Em *P. alata*, os testes histoquímicos evidenciaram resultado positivo nas células da epiderme nectarífera e também do parênquima nectarífero, indicando a presença de compostos hidro e lipofílicos no interior das mesmas células. A natureza lipofílica dos idioblastos encontrados no parênquima nectarífero é evidenciada pelo resultado positivo para compostos alifáticos; no interior destas células, os testes evidenciam a co-ocorrência de terpenóides, compostos fenólicos totais e alcalóides; a reação PAS nestas células apresenta resultado positivo no controle, indicando que este resultado é falso positivo e não deve ser considerado para efeitos analíticos.

Em *P. edulis*, polissacarídeos e compostos fenólicos são localizados no interior das células da epiderme nectarífera (figura 69). As secções a fresco detectam a presença de antocianinas apenas na epiderme não secretora (figura 65).

Análises químicas qualitativas do néctar em MS (figuras 70-73)

Açúcares – glicose e/ou frutose⁸ e sacarose são detectadas no espectro *full scan* do néctar de ambas as espécies (figuras 70,71,72).

Compostos bioativos - o flavonóide apigenina é detectado no néctar em ambas as espécies (figuras 70, 73) e os alcalóides harmana, harmina e harmalina em *P. edulis* (figuras 72 e 73), a partir dos espectros obtidos em *full scan* de *P. alata* e referentes aos intervalos da razão massa/carga (m/z) de ambas as espécies.

A diferença nas massas correspondentes à glicose ou frutose (MM⁹=180g/mol), sacarose (MM=342g/mol), apigenina (MM=270g/mol), harmana (MM=189g/mol), harmina

⁸ A técnica aplicada não diferencia isômeros.

⁹ Massa molar.

(MM=228g/mol) e harmalina (MM=221g/mol) decorrem da ligação destes compostos com íons hidrogênio (MM=1g/mol), sódio (MM=23g/mol) ou potássio (MM=39g/mol) ¹⁰.

Análise dos cristais em MEV – EDS (figuras 74-78)

Em *P. alata*, os NEF peciolares apresentam cristais morfologicamente distintos: agregado cristalífero (figura 74, *inset*) e areia cristalífera (figura 75, *inset*), ambos no parênquima nectarífero de um mesmo NEF.

O material metalizado com ouro coloidal apresenta um pico relativo à camada espessa deste metal usada para cobrir o material botânico (figura 74, seta); para evitar o surgimento deste artefato, o material foi coberto com carbono (figuras 75-78).

O espectro obtido com o feixe focado no cristal tipo agregado cristalífero denota a presença de átomos de cálcio, carbono e oxigênio, em que a abundância relativa de cálcio é a maior observada (figura 74). O pico relativo ao nitrogênio é muito semelhante ao ruído apresentado pelo espectro e não será considerado para efeitos analíticos.

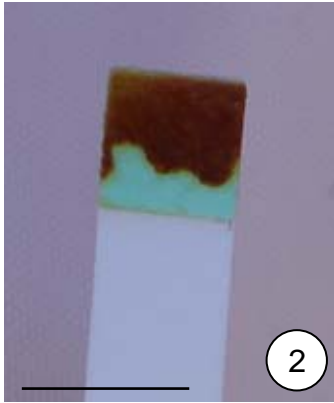
Os espectros evidenciados nas figuras 75 e 76 correspondem a areia cristalífera e ao sinal *background*, respectivamente. O espectro relativo à areia cristalífera detecta átomos de alumínio, cálcio, carbono, enxofre, ferro, fósforo, oxigênio, silício e sódio, em que o ferro apresenta a maior abundância relativa. A análise comparativa do *background* evidencia a presença de carbono, enxofre, fósforo, oxigênio e sódio; à exceção de carbono e oxigênio, constituintes comuns da parede celular, os átomos detectados estão

¹⁰ O espectrômetro de massas fornece a massa de íons; moléculas neutras, que não contêm grupos químicos naturalmente carregados, não são detectadas. A glicose, uma molécula neutra, apresenta uma massa molecular nominal de 180Da. A ionização desta molécula envolve a incorporação de adutores iônicos, sendo comuns os cátions sódio (Na⁺) e potássio (K⁺). Neste processo, o adutor participa de ligações coordenadas com o analito, fornecendo a ele sua própria carga. No processo de ionização da glicose com o cátion Na⁺, a massa iônica da glicose passa de 180Da para 203Da, ou seja, seu íon pseudo-molecular tem m/z 203 [M+Na]⁺. Se $z=1$, pela subtração do adutor se conhece a massa do composto original: m/z 203– 23 (Na⁺)=180Da (Souza 2008).

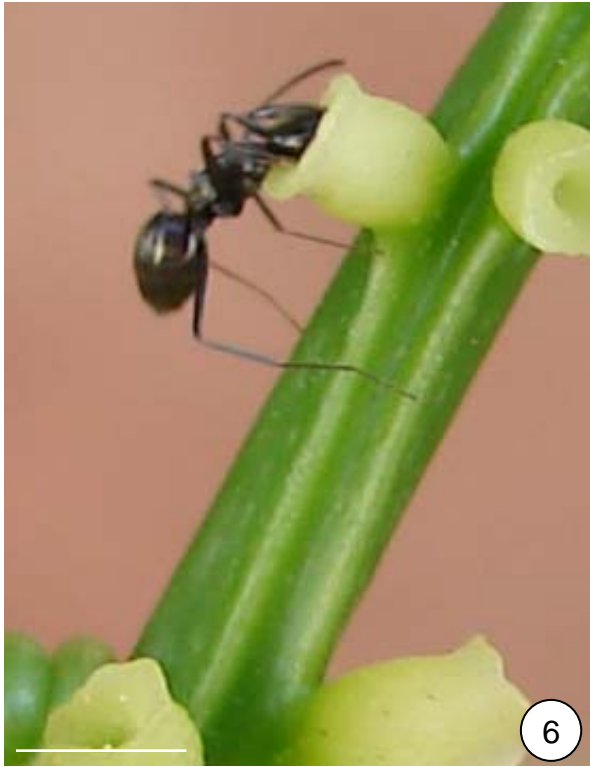
em concentrações relativas insuficientes, sendo desconsiderados no espectro relativo à areia cristalífera.

Cristais do tipo drusas são encontrados no parênquima nectarífero dos NEF peciolares de *P. edulis* (figuras 77 e 78, *inset*). Os espectros evidenciam a presença de átomos de carbono, oxigênio, cálcio e sódio, em que a abundância relativa de cálcio é a maior enquanto a de sódio é muito próxima ao limite operacional do sistema e não será considerada para efeitos analíticos. As drusas presentes em diferentes regiões de um mesmo NEF apresentam os mesmos elementos químicos constituintes.

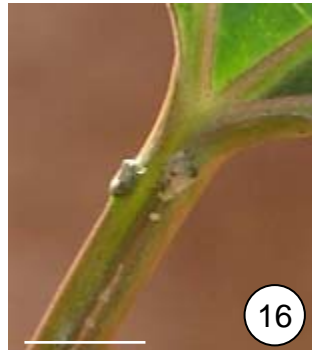
Figuras 1-5. Nectários extraflorais (NEF) peciolares de *Passiflora alata* Curtis; procedimentos para evitar a coleta e evidenciar a presença de açúcar no exsudato. 1. Ramo isolado com graxa inócua. 2. Resultado positivo na glicofita. 3. Ápice caulinar vegetativo e três nós visíveis subseqüentes; dois pares de NEF assincrônicos no segundo nó e um par no terceiro nó. 4. Fase secretora; notar exsudato profuso na glândula superior. 5. Fase pós-secretora no par inferior. Barras: 2cm.



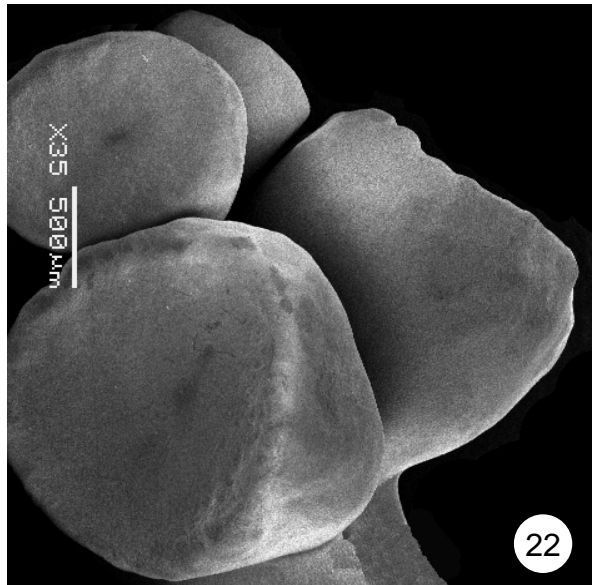
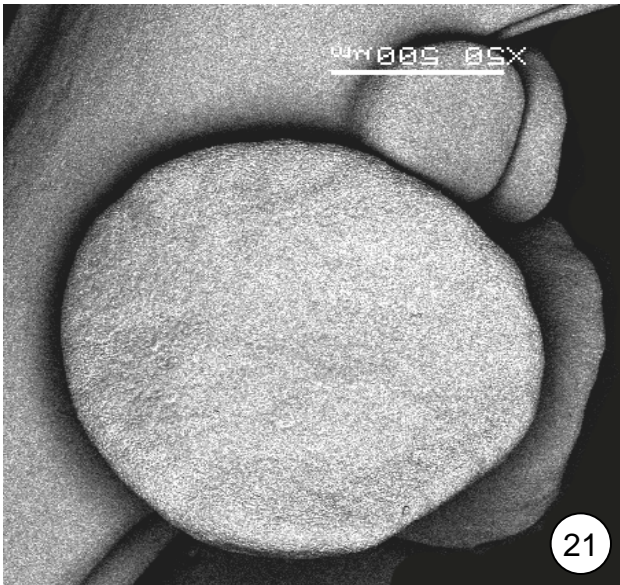
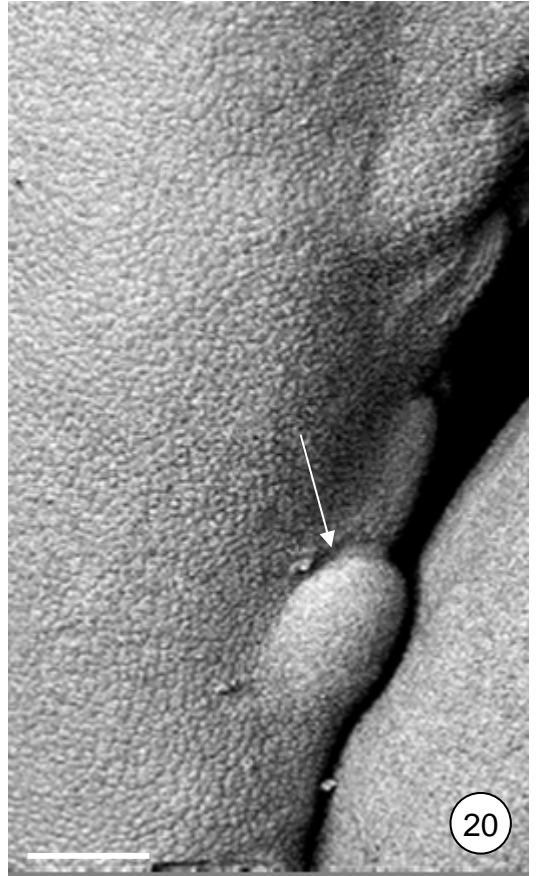
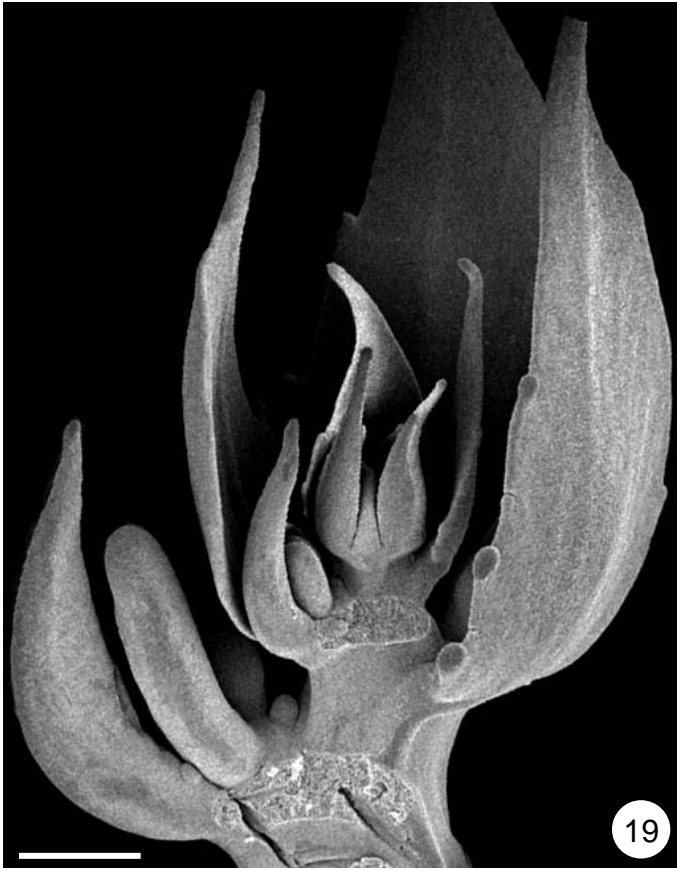
Figuras 6-9. Coletores nos NEF peciolares de *Passiflora alata* Curtis. 6,7. Formigas do gênero *Crematogaster* coletando néctar nas glândulas superiores (6) e inferiores (7) do quarto e sexto nós, respectivamente. 8,9. Abelhas da espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille 1811) pilhando néctar no quinto (8) e sétimo nós (9). Barras: 1cm.



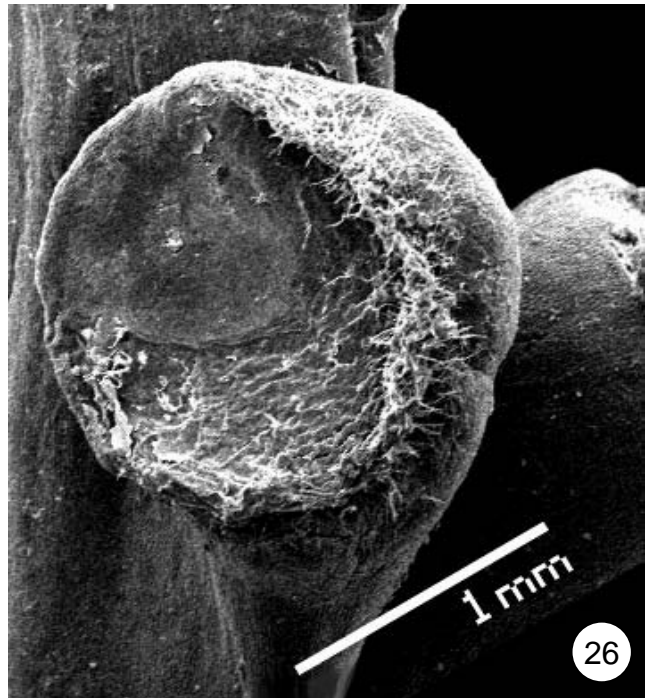
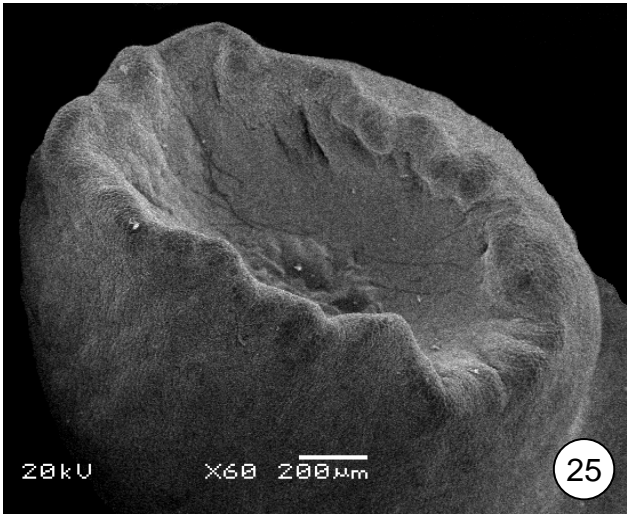
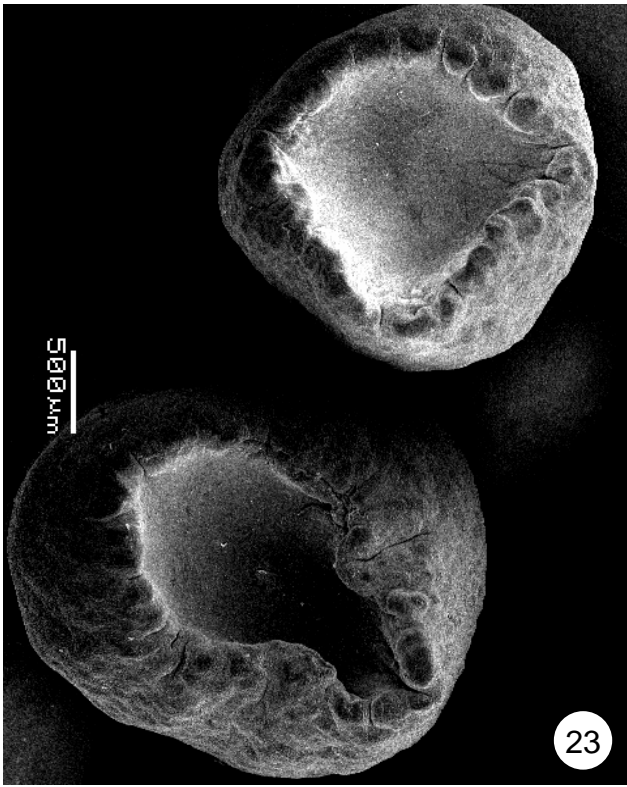
Figuras 10-18. NEF peciolares de *P. edulis* Sims. 10,12,13,16. Indivíduo sombreado. 11,14,15,17,18. Indivíduo exposto ao sol. 10,11. Ápice caulinar vegetativo e nós visíveis subseqüentes. 12-15. Um par de NEF sincrônicos em fase secretora. 13,15. Notar exsudato profuso. 16. Fase pós-secretora. 17,18. Formigas do gênero *Crematogaster* coletando néctar. Barras: 1cm.



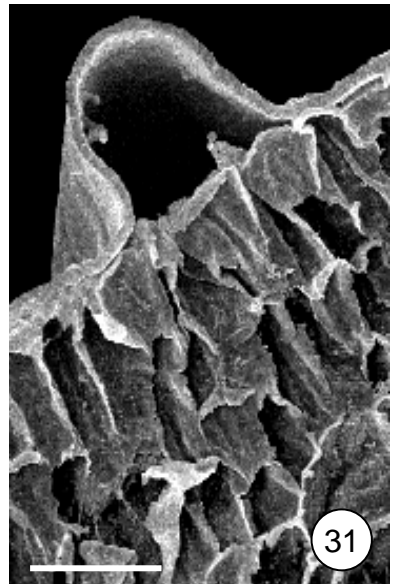
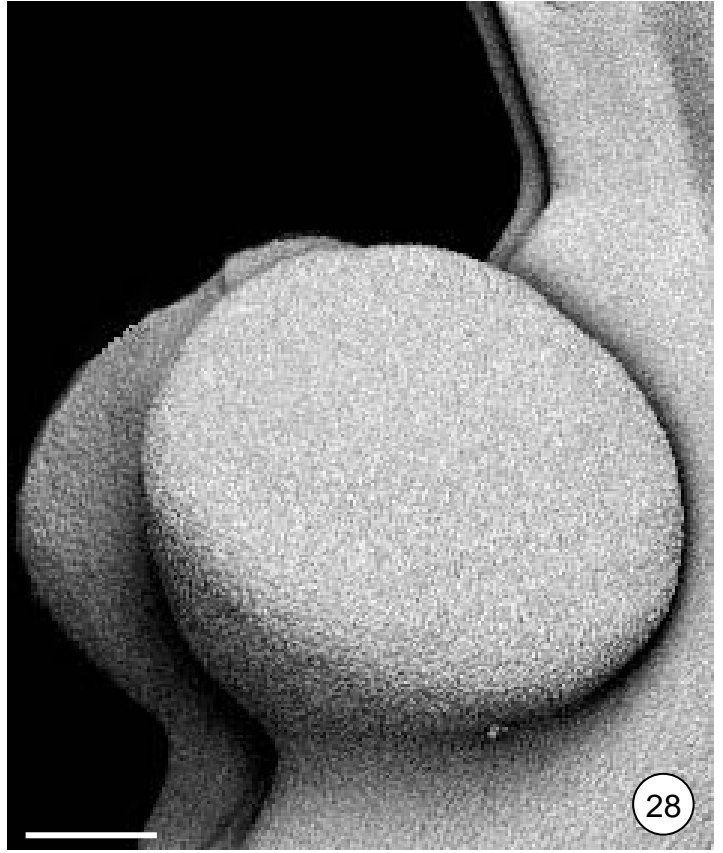
Figuras 19-22. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. alata* Curtis em MEV: fase meristemática à pré-secretora. 19. Ápice caulinar vegetativo e nós subseqüentes. 20. NEF em fase meristemática no primórdio foliar (seta). 21,22. Par superior em fase meristemática e par inferior em fase pré-secretora; formato aplainado (21) e crateriforme (22). Barras: 1mm (19), 500 μ m (20).



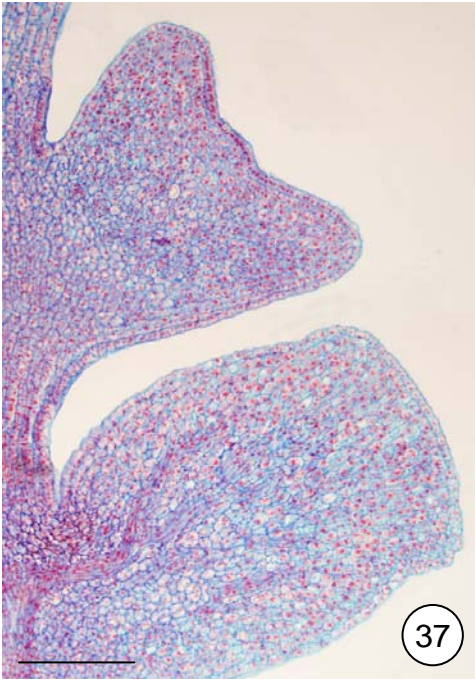
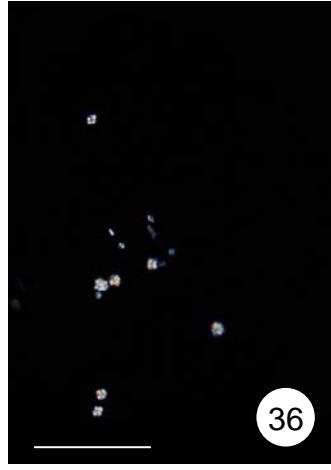
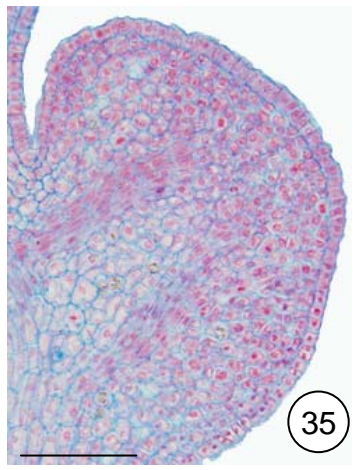
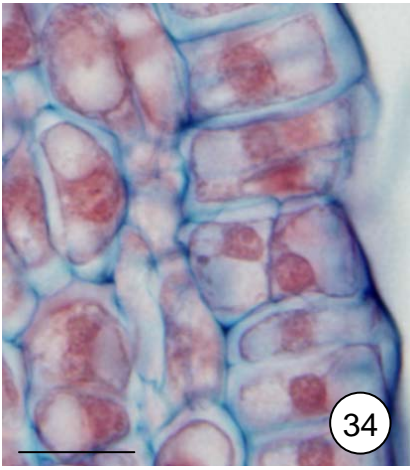
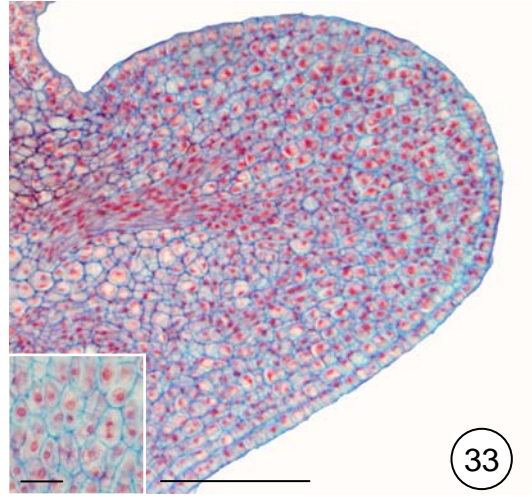
Figuras 23-26. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. alata* Curtis em MEV: fase pré-secretora à pós-secretora. 23. NEF superior em fase pré-secretora e inferior em fase secretora. 24,25. Formato estipitado-crateriforme do NEF em fase pré-secretora (24); cutícula distendida do nectário em fase secretora (25). 26. NEF em fase pós-secretora; notar hifas de fungos.



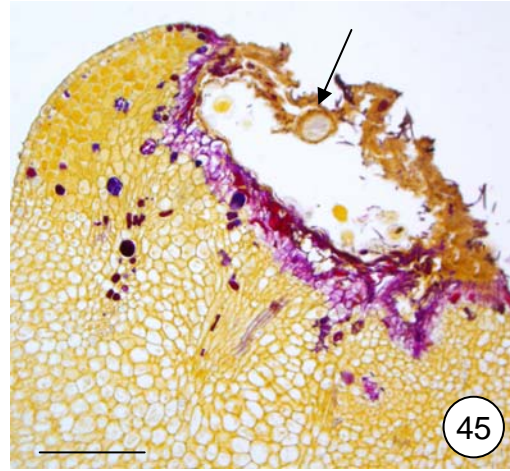
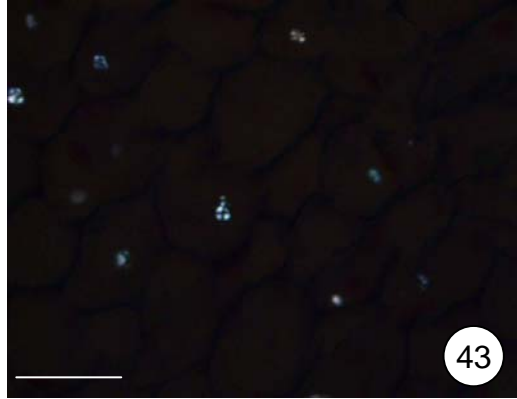
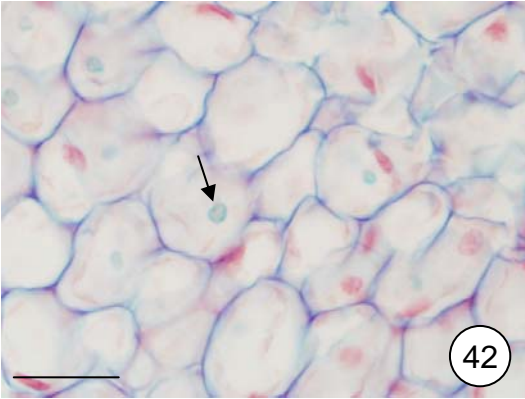
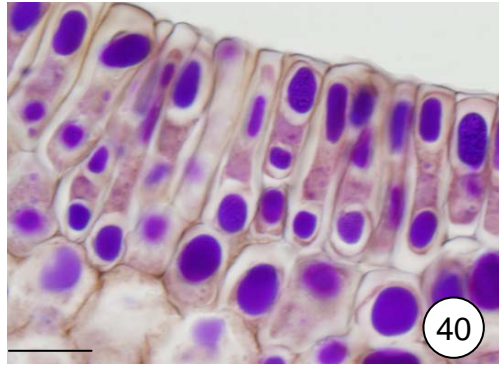
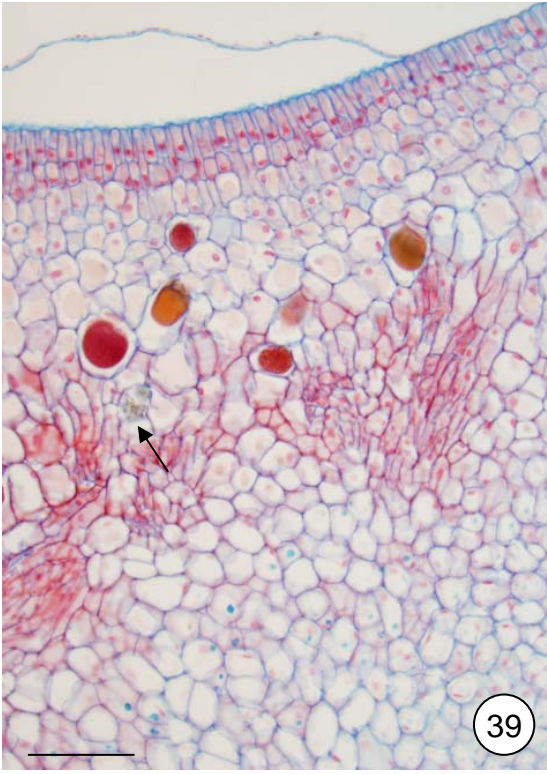
Figuras 27-31. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. edulis* Sims em MEV: fase meristemática à secretora. 27. Ápice caulinar vegetativo; NEF em fase meristemática no primórdio foliar (seta). 28. NEF em início da fase pré-secretora; formato aplainado. 29-31. NEF em fase secretora; formato convexo; notar cutícula distendida (29,30) e espaço subcuticular (31). Barras: 1mm (27), 500 μ m (28-30), 300 μ m (31).



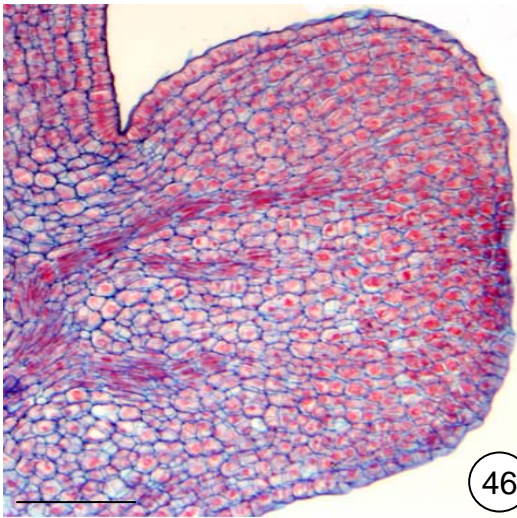
Figuras 32-38. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. alata* Curtis. Fase meristemática (32-37) à pré-secretora (37-38). Secções longitudinais. 32. Protuberância no primórdio foliar. 33. Meristema fundamental em divisão no *inset*; notar cordão procambial. 34. Divisão periclinal na protoderme. 35,36. Cristais evidenciados em luz polarizada (36). 37. Glândula superior em fase meristemática e inferior em fase pré-secretora. 38. Parênquima nectarífero visualizado pelo denso conteúdo celular (pré-néctar). Barras: 25 μ m (32), 75 μ m (33,38), 10 μ m (34), 30 μ m (35,36), 150 μ m (37).



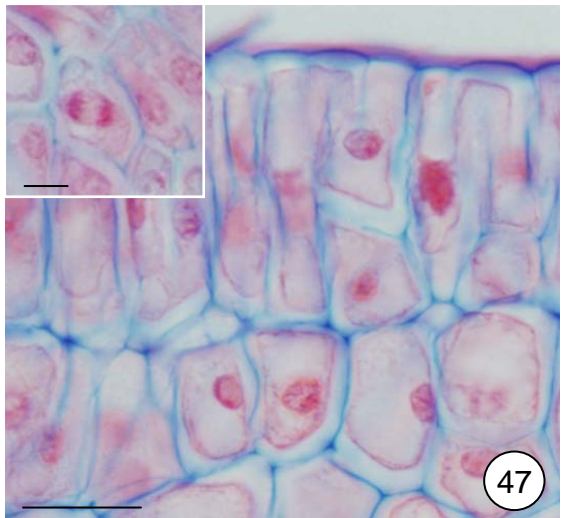
Figuras 39-45. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. alata* Curtis. Fase secretora (39-44) à pós-secretora (45). Secções longitudinais. 39. Cutícula distendida; idioblastos no parênquima nectarífero e nas terminações do floema; cristais (seta). 40,41. Epiderme nectarífera múltipla. 42,43. Grãos de amido (seta) evidenciados em luz polarizada (43). 44. Células epidérmicas pavimentosas na periferia do NEF. 45. Notar hifas de fungos (seta). Barras: 75µm (39), 25µm (40,42,43), 10µm (41), 30µm (44,45).



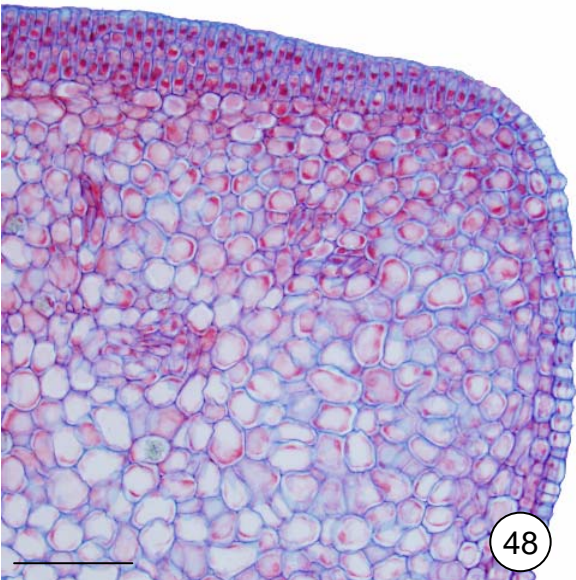
Figuras 46-51. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. edulis* Sims. Fase meristemática (46,47), pré-secretora (48,49) e secretora (50,51). Secções longitudinais. Fixadores: FAA (46,47, 50,51) e FNT (48,49). 46. Notar cordões procambiais. 47. Divisão peri e anticlinal na protoderme; meristema fundamental em divisão no *inset*. 48. Células epidérmicas pavimentosas na periferia do NEF. 48,49. Epiderme nectarífera múltipla. 50,51. Epiderme e parênquima nectaríferos; notar pré-nectar no interior das células secretoras. Barras: 30 μ m (46,51), 25 μ m (47), 75 μ m (48-50).



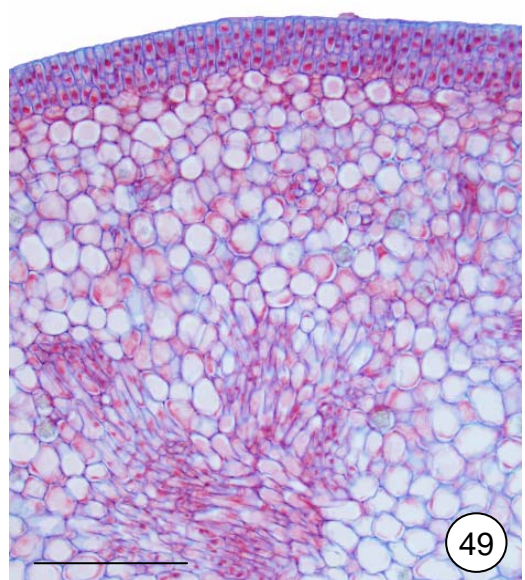
46



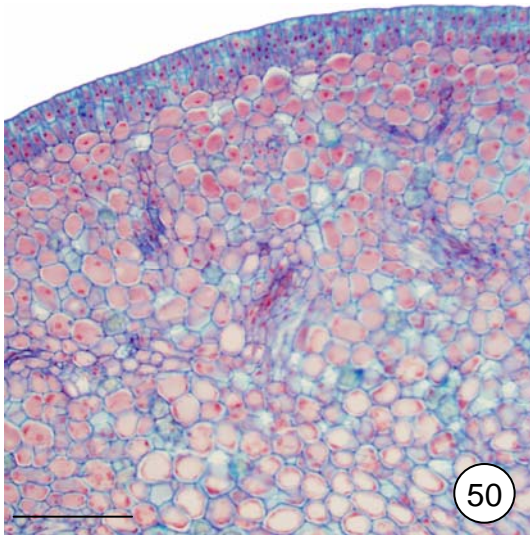
47



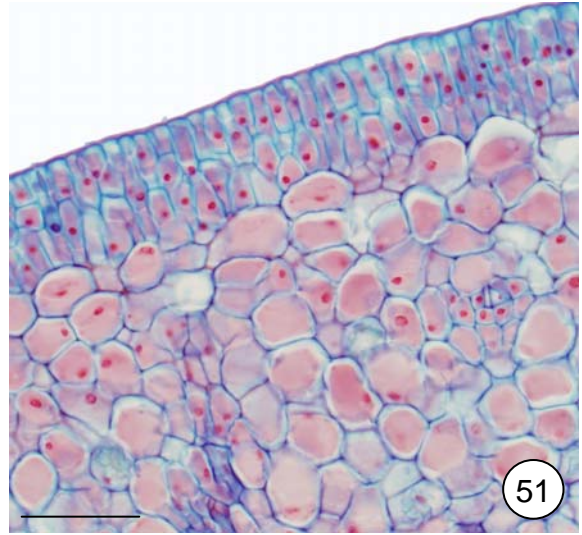
48



49

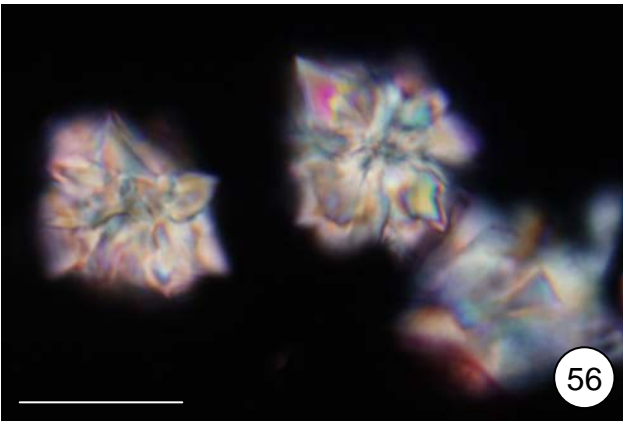
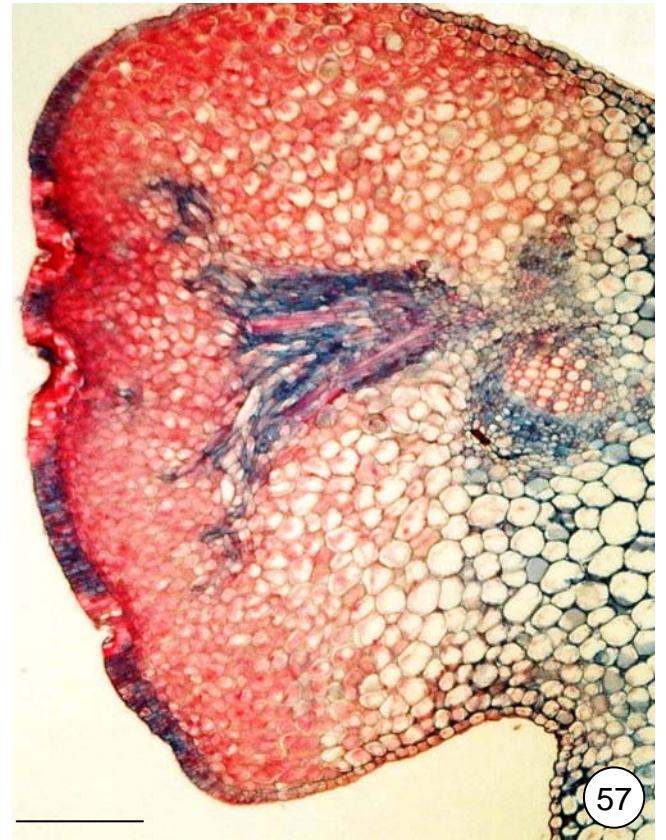
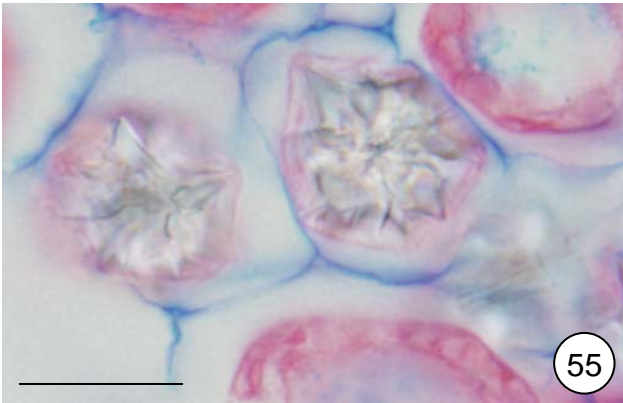
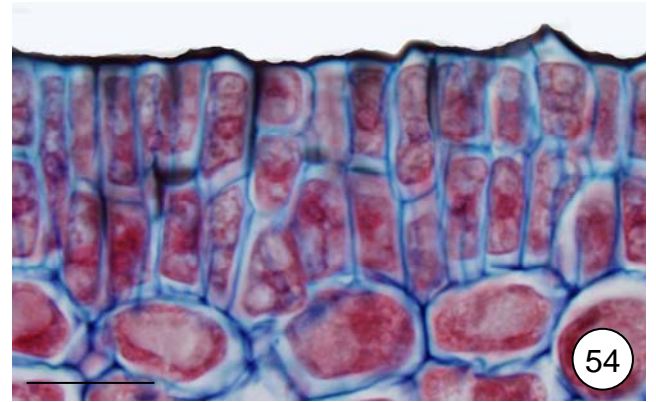
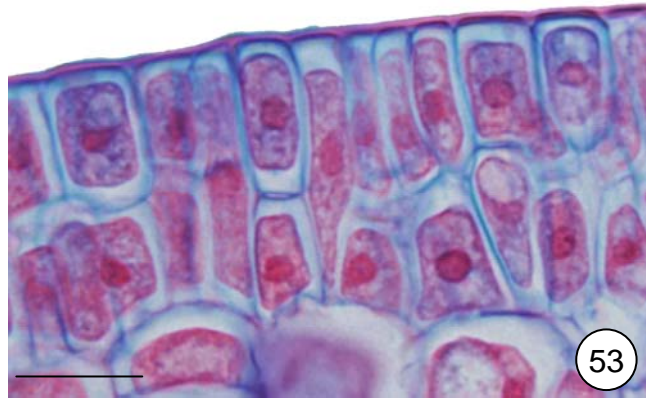
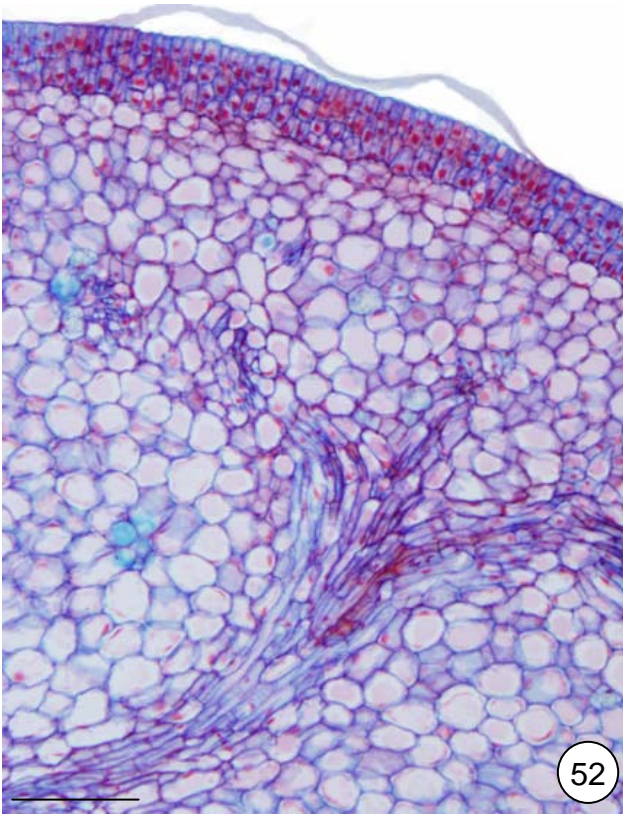


50

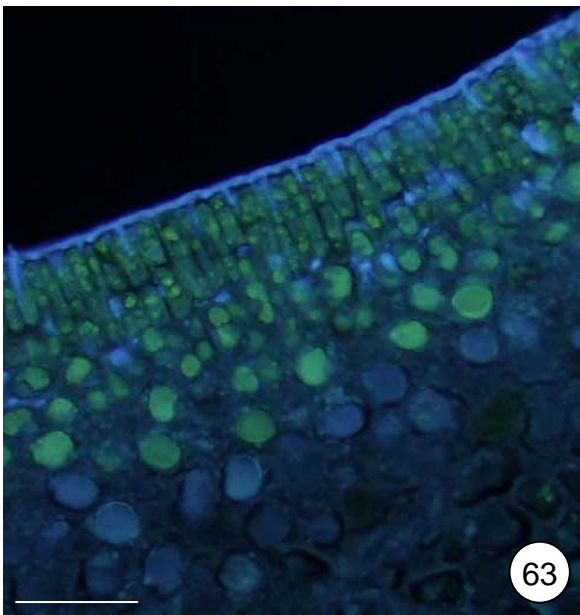
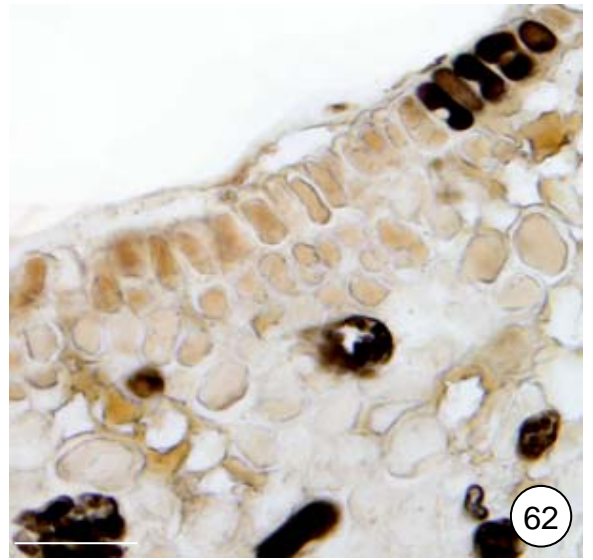
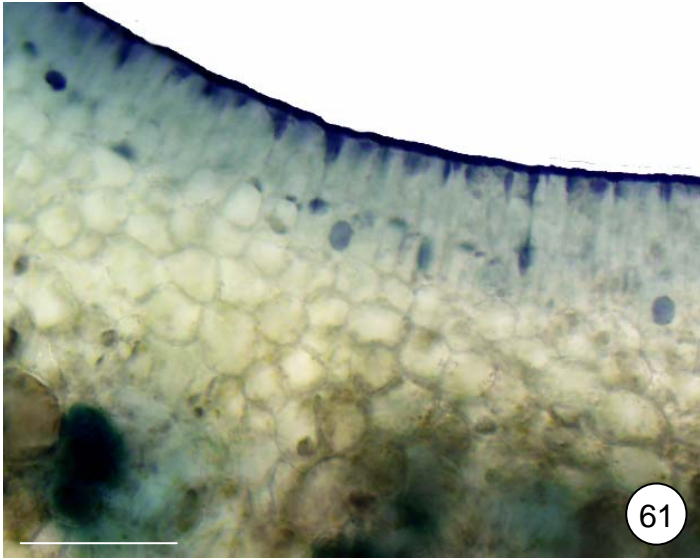
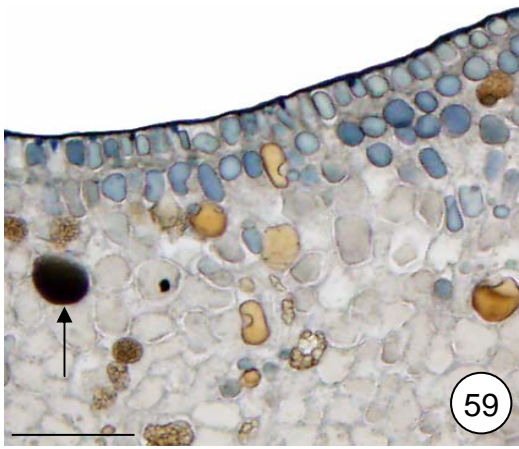
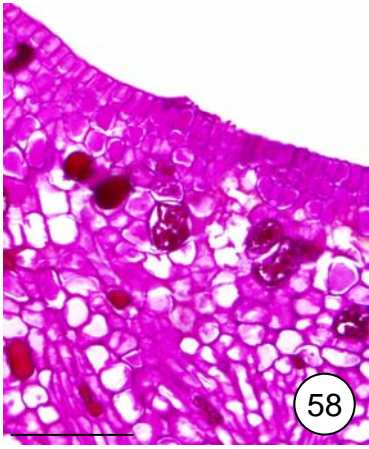


51

Figuras 52-57. Ontogênese dos NEF peciolares de *P. edulis* Sims. Fase secretora (52-56) à pós-secretora (57). Secções longitudinais. 52. Cutícula íntegra distendida; parênquima nectarífero e subnectarífero delimitados pelas terminações vasculares. 53,54. Epiderme nectarífera múltipla, flanges cuticulares evidenciados pelo preto de Sudão B (54). 55,56. Cristais no parênquima nectarífero evidenciados em luz polarizada (56). 57. Notar perda da integridade da epiderme. Barras: 75µm (52), 25µm (53-56), 150µm (57).



Figuras 58-64. Localização *in situ* de compostos químicos nos NEF peciolares em fase secretora de *P. alata* Curtis. Secções longitudinais. Fixadores: FAA (58,60,63,64), FNT (59), SFF (62); material fresco (61). 58. Reação PAS. 59. Preto de Sudão B. 60. Reação PAS e preto de Sudão B. 61. Reagente de Nadi. 62. Notar compostos fenólicos na epiderme pavimentosa e nos idioblastos secretores. 63. Reagente natural A. 64. Reagente de Dragendorff. Barras: 50µm (58,62,64), 75µm (60,61), 30µm (63,59).



Figuras 65-69. Localização *in situ* de compostos químicos nos NEF peciolares em fase secretora de *P. edulis* Sims. Secções longitudinais. Material fresco (65); fixadores: FAA (66,68), FNT (67), SFF (69). 65. Antocianinas. 66. Reação PAS. 67. Reação PAS e preto de Sudão B. 68. Preto de Sudão B. 69. Notar compostos fenólicos na epiderme nectarífera. Barras: 150µm (65), 75µm (66-68), 30µm (69).

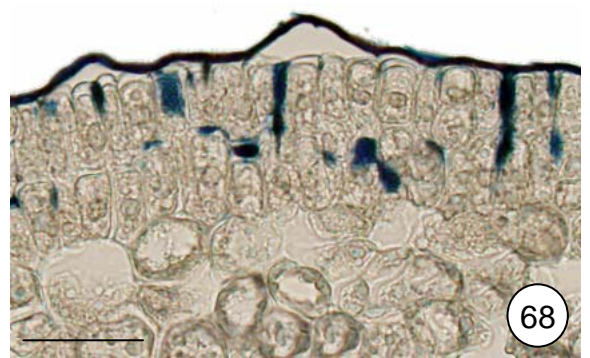
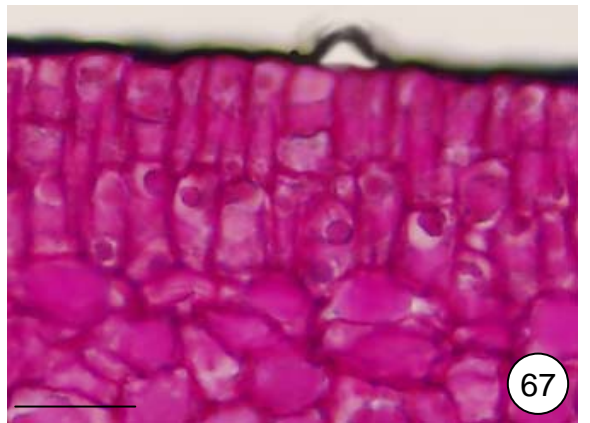
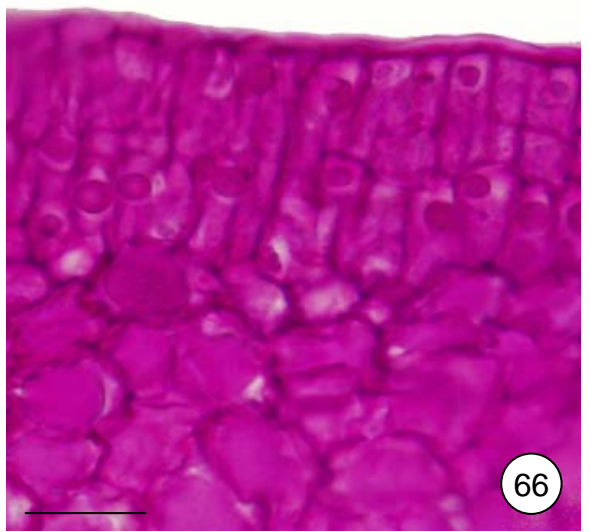


Figura 70. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF peciolares de *P. alata* Curtis em modo positivo; *full scan*. Perfil dos íons correspondentes a glicose e/ou frutose (m/z 203 e 219), sacarose (m/z 343, 361 e 381) e apigenina (m/z 271).

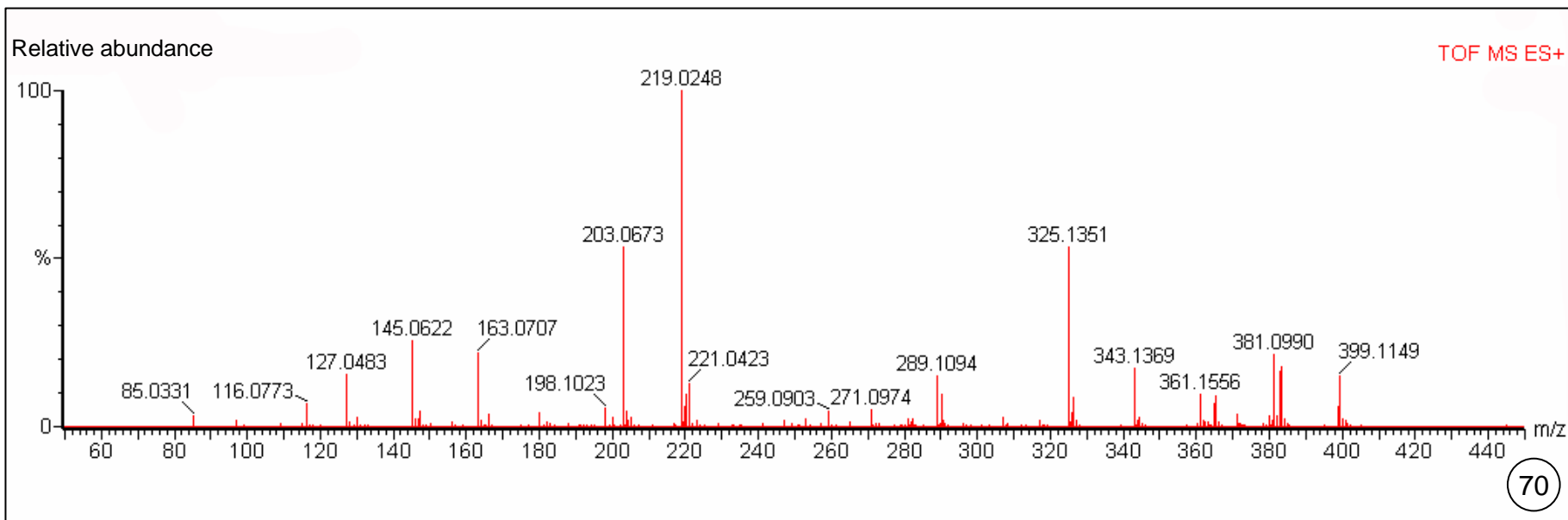
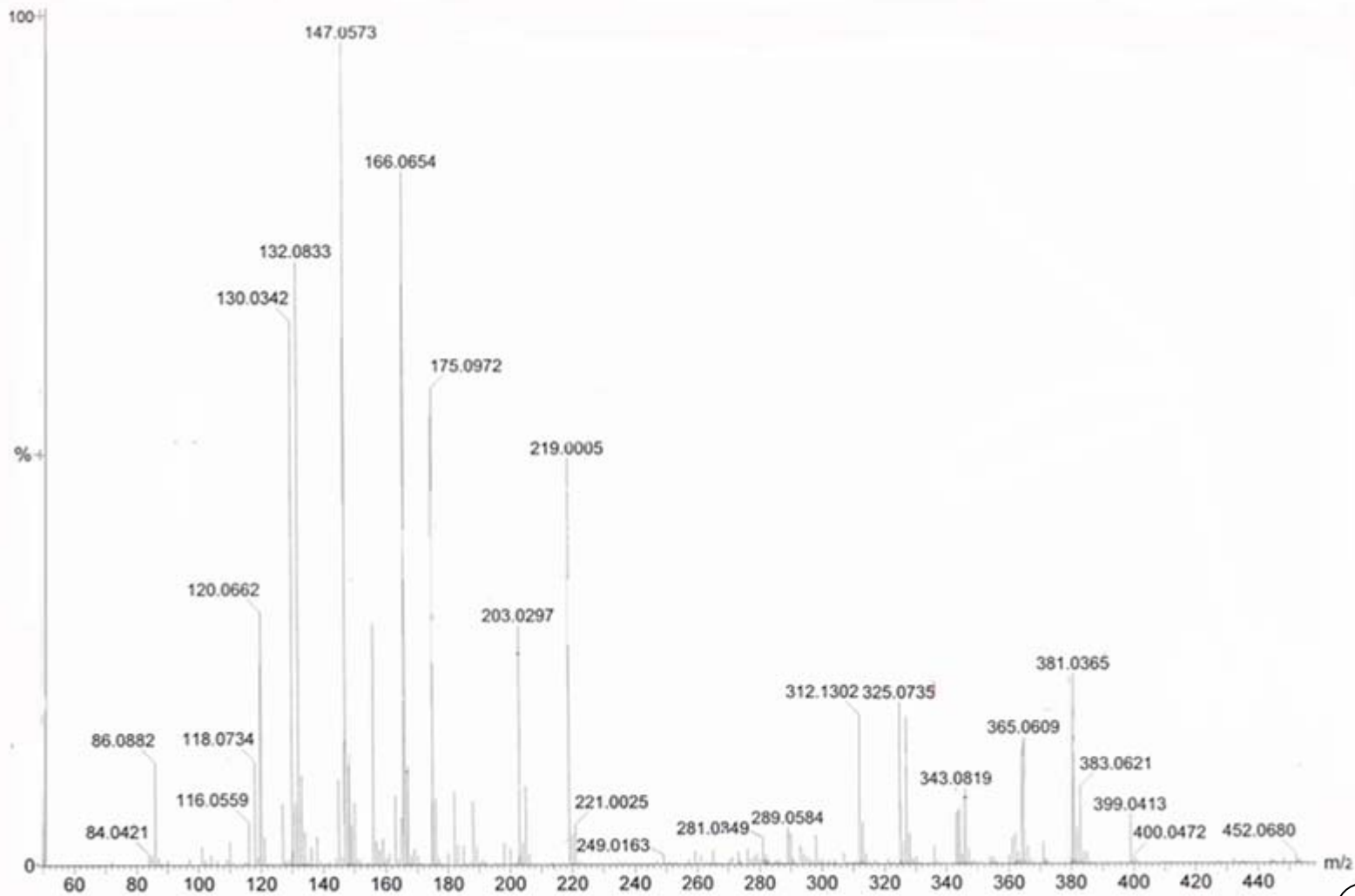
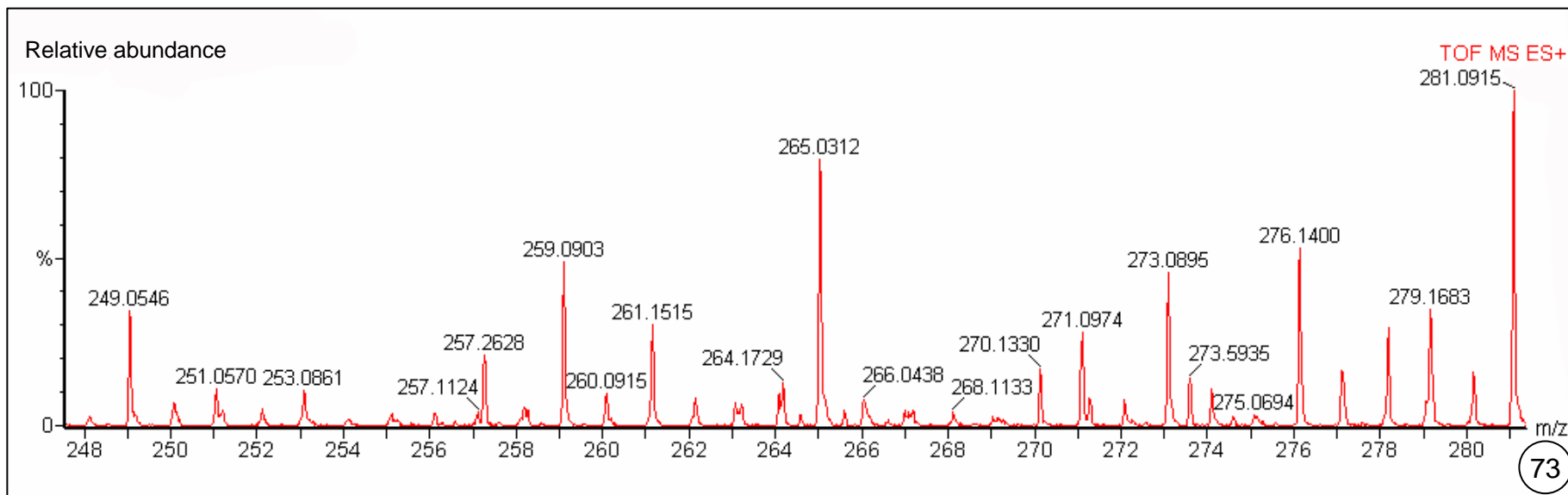
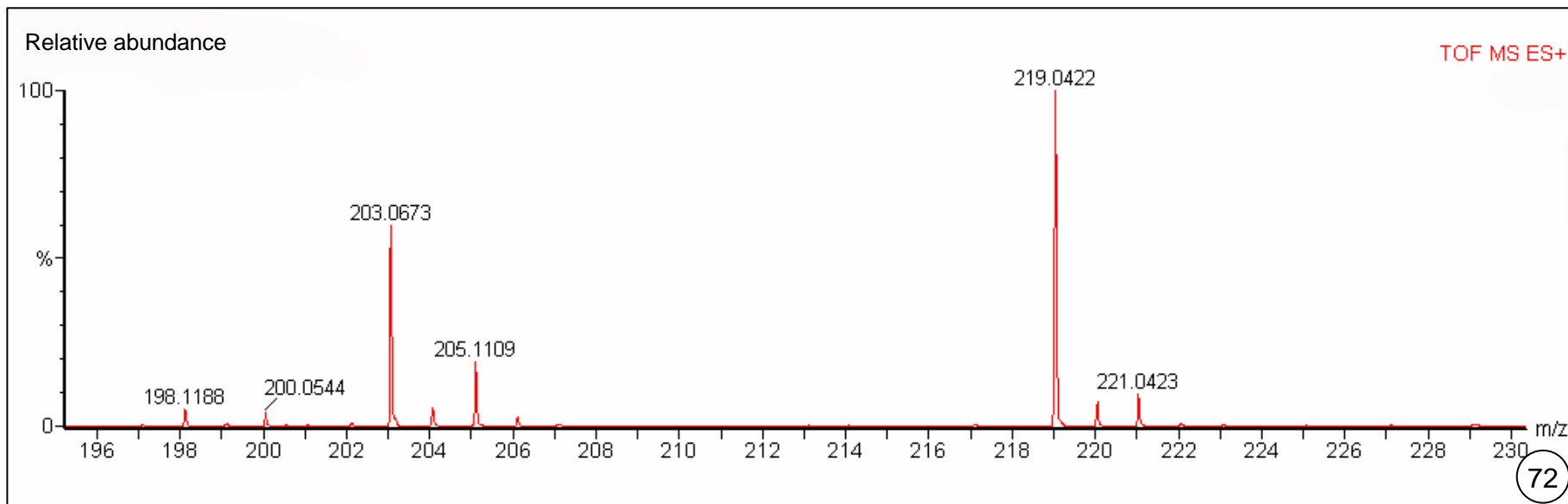


Figura 71. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF peciolares de *P. edulis* Sims em modo positivo; *full scan*. Perfil dos íons correspondentes a glicose e/ou frutose (m/z 203 e 219) e sacarose (m/z 343, 365 e 381).

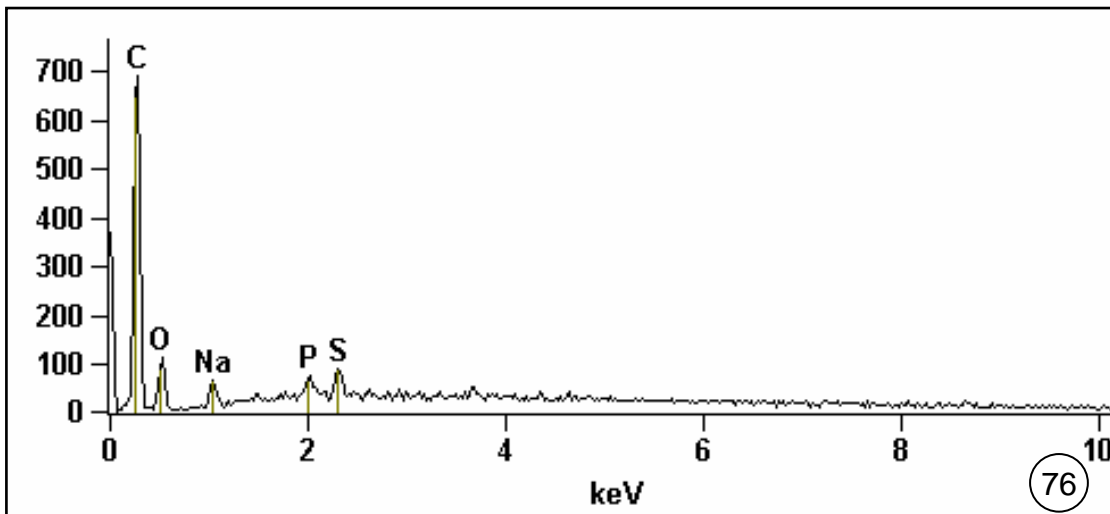
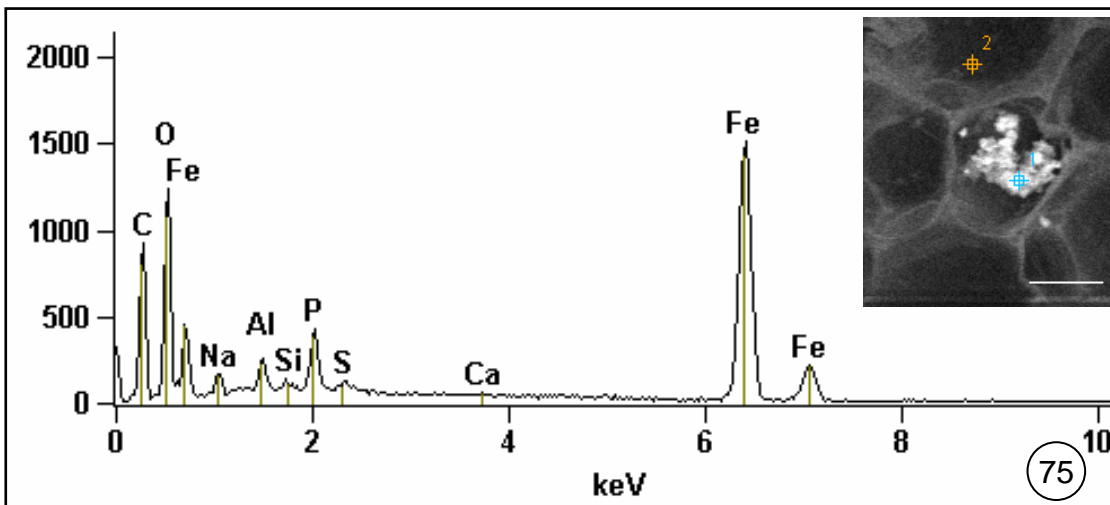
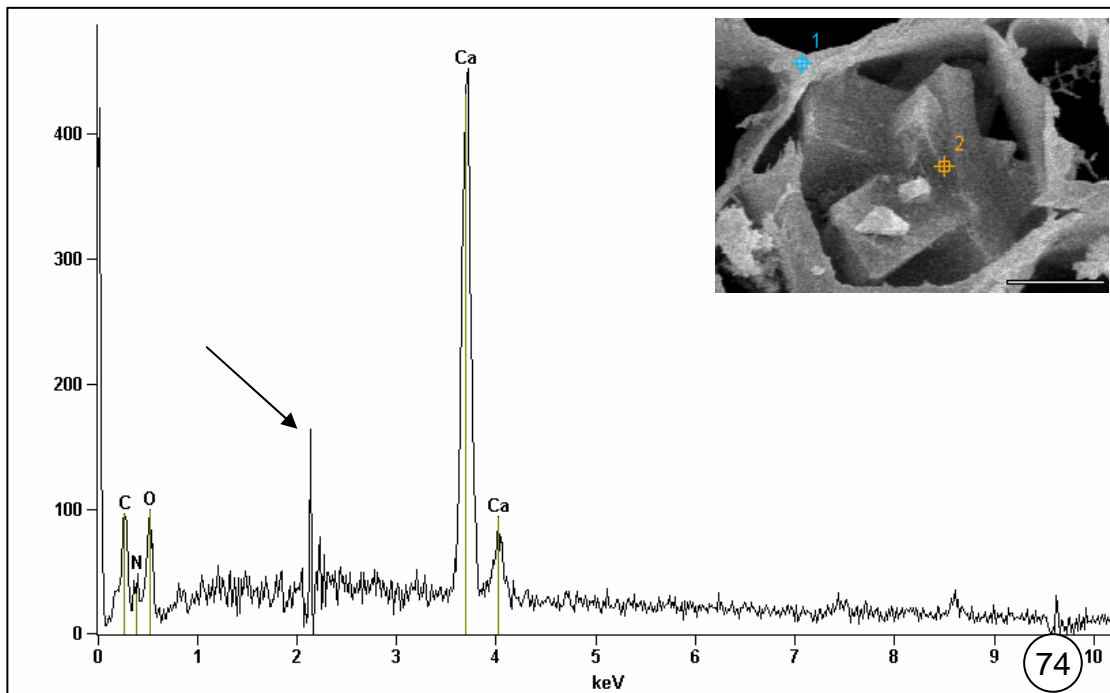
Relative abundance



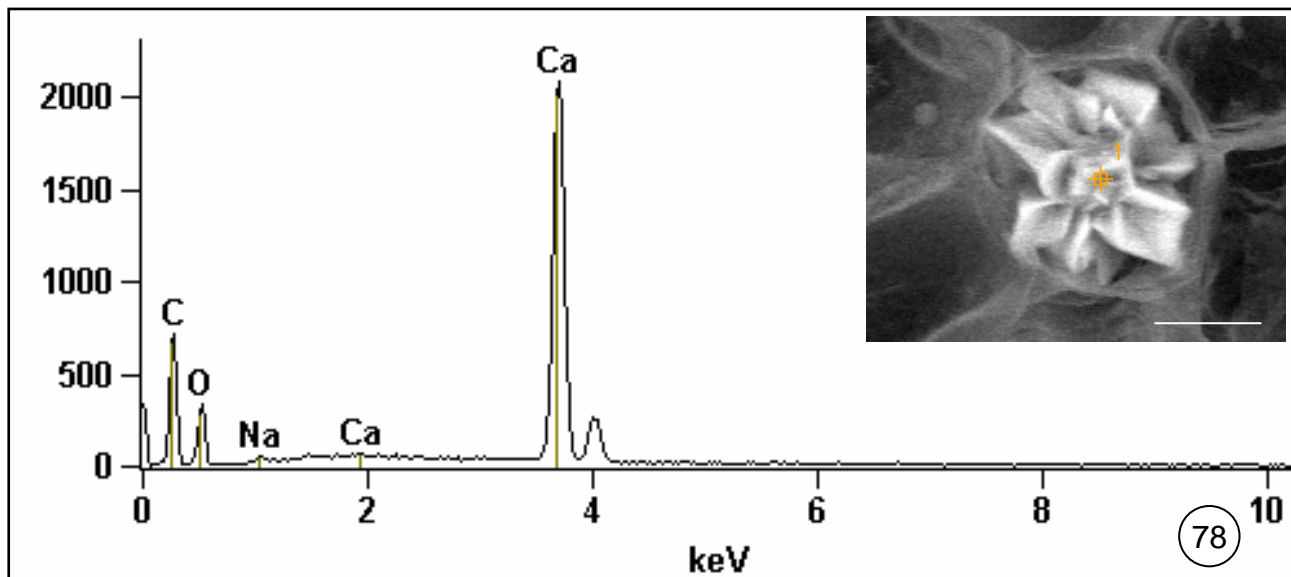
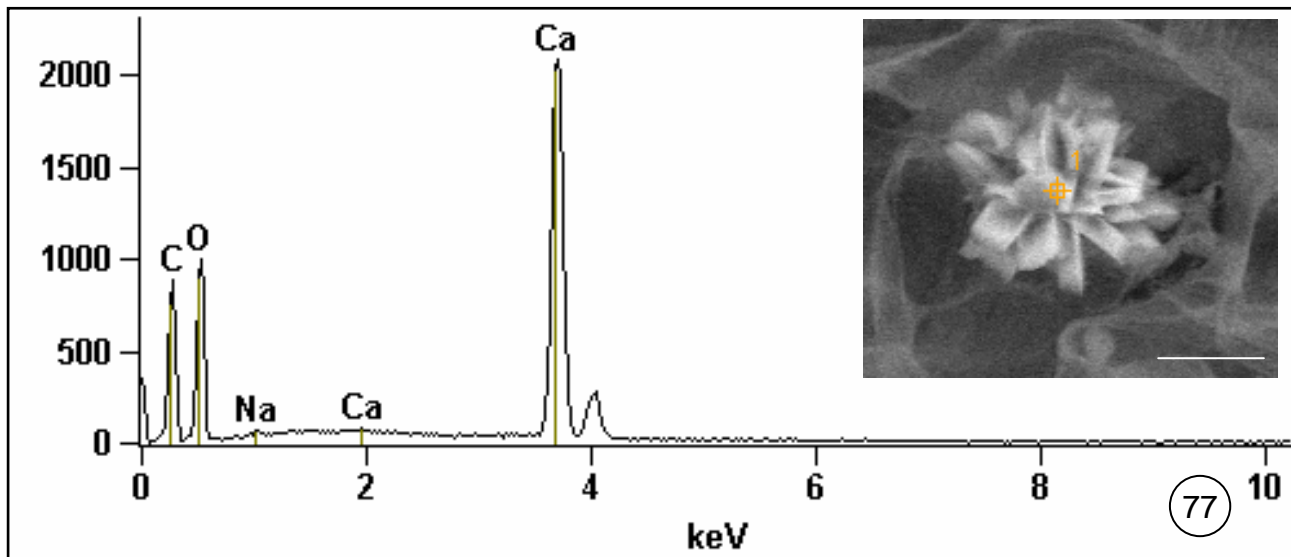
Figuras 72-73. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF peciolares de *P. edulis* Sims em modo positivo; detalhe dos íons situados entre m/z 196-280. Perfil dos íons correspondentes a glicose e/ou frutose (m/z 203 e 219), harmana (m/z 221) (72), harmina (m/z 251), harmalina (m/z 253) e apigenina (m/z 271) (73).



Figuras 74-76. Espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (EDS) dos cristais presentes nos NEF peciolares de *Passiflora alata* Curtis. 74. Espectro obtido com o feixe focado no ponto 1 da amostra de cristal; agregado cristalífero no *inset*; a seta indica o pico referente à metalização com ouro. 75,76. Espectros obtidos com o feixe focado no ponto 1 da amostra de cristal (75) e no ponto 2 para obtenção dos sinais de *background* (76); areia cristalífera no *inset* (75). Barras: 5 μ m.



Figuras 77-78. Espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (EDS) dos cristais presentes nos NEF peciolares de *Passiflora edulis* Sims. Espectros obtidos com o feixe focado no ponto 1 da amostra de cristal; drusas no *inset*. Cada espectro corresponde a um cristal localizado em posições diferentes de um mesmo NEF. Barras: 5 μ m.



Discussão

Morfologia e implicações ecológicas dos NEF

O resultado obtido com a glicofita, a presença de formigas do gênero *Crematogaster* coletando o exsudato e fungos na fase pós-secretora são evidências consistentes de que as glândulas peciolares em *Passiflora alata* e *P. edulis* são NEF (Keeler 1977, 1980; Keeler & Kaul 1979; Smith *et al.* 1990; Vogel 1998; Apple & Feener 2001, Dias 2008). Estudos realizados de forma isolada provêm apenas indícios da natureza química do exsudato liberado pela glândula. Um exemplo de equívoco em Passifloraceae são as glândulas peciolares de *P. foetida*: inicialmente foram identificadas como NEF devido à sua estrutura e posição na planta (Roth 1968); posteriormente, o exsudato foi analisado apenas para a determinação do conteúdo de aminoácidos presentes, com o objetivo de comparar a qualidade do néctar em diferentes tipos de nectários (Baker *et al.* 1978b); e apenas a partir do estudo em que observações de campo, anatomia e histoquímica das glândulas e análise química do exsudato foram realizadas em conjunto, evidenciou-se que estas glândulas são lipofílicas (Durkee *et al.* 1984). A partir deste trabalho, estudos que legitimem a natureza do exsudato como néctar são necessários à caracterização de glândulas peciolares em espécies de *Passiflora*.

Os açúcares presentes no exsudato são a principal fonte de recursos para formigas mutualistas do gênero *Crematogaster* (Lanza 1988). A visualização de néctar profuso após o isolamento dos ramos com graxa inócua evidencia que o exsudato é coletado de forma constante. Em Passifloraceae, relações mutualistas foram descritas em cinco espécies de *Passiflora* – *P. adenopoda*, *P. coccinea*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis* e *P. vitifolia* – em que as formigas removem lagartas de *Heliconius* e outros dípteros, além de coleópteros e ortópteros (Gilbert 1971, McLain 1983, Smiley 1986, Wirth & Leal 2001, Leal *et al.* 2006).

Além das formigas, abelhas, vespas e outros insetos coletam néctar a partir de NEF (Baker *et al.* 1978a, O'Dowd 1979, Elias 1983). O registro de *Tetragonisca angustula* coletando néctar em um NEF é inédito. Estes insetos não apresentam comportamento agressivo e, neste contexto, são análogos aos pilhadores, no mesmo senso usado para visitantes florais que não polinizam.

O espectro de sensibilidade à visão de cores das borboletas Heliconiinae é de 300 a 700nm, e os picos de máxima sensibilidade são 450 e 560nm, correspondentes às cores azul e amarelo, respectivamente (Struwe 1972). As espécies de borboletas que mais consomem espécies de *P. alata* e *P. edulis* nos trópicos são *Agraulis vanillae*, *Dione juno*, *Eueides isabella*, *Heliconius erato* e *H. melpomene* (Spencer 1988). Entre estas espécies, destacam-se *Agraulis vanillae*, *Eueides isabella* e *Heliconius erato*, cujos NEF de *P. alata* apresentam alta semelhança com os ovos destas espécies, tanto na coloração quanto no tamanho (Dell'Erba *et al.* 2005). As borboletas destas espécies ovipõem apenas em órgãos jovens da planta que não possuam ovos prévios (Benson 1978, Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996, Dell'Erba *et al.* 2005). Desta forma, os NEF peciolares de *P. alata* são estruturas *egg mimics*, prevenindo a oviposição pelas fêmeas de insetos deste grupo, e evitando o seu consumo pelas lagartas. As espécies de borboletas acima mencionadas depositam seus ovos isolados ou um a três em *E. isabella*. A pressão exercida pelas borboletas destas espécies poderia explicar a variação no número de glândulas existentes em um mesmo indivíduo de *P. alata*, simulando oviposições distintas em cada pecíolo.

Indivíduos de *P. edulis* expostos ao sol apresentam antocianinas na epiderme de órgãos jovens e são menos consumidos em relação aos indivíduos sombreados. As antocianinas destacam-se como defesas constitutivas que atuam sobre o herbívoro e são moduladas pelas plantas (Koptur 1992). Estes pigmentos são associados à proteção contra radiação ultravioleta excessiva, à manutenção da integridade do protoplasto (Taiz &

Zeiger 2009) e à inibição de folívoros devido ao não reconhecimento da cor vermelha (Karageorgou *et al.* 2008). Espécies do gênero *Heliconius* não apresentam sensibilidade aos comprimentos de onda relativos a esta cor (Crane 1955) e podem não reconhecer os órgãos jovens preferenciais para a oviposição, o que justificaria o menor consumo de plantas expostas ao sol. Entretanto, o parasitismo e a predação destas espécies poderiam diminuir a incidência de herbívoros: estes dois eventos podem prevalecer em lianas presentes em áreas iluminadas pelo sol e explicar porque algumas espécies de borboletas são incomuns nestes locais (Bentley 1976, Benson 1978).

Os NEF de ambas as espécies apresentam fase secretora a partir do primeiro nó visível e a fase pós-secretora ocorre a partir do quinto e sexto nós visíveis em *P. edulis* e *P. alata*, respectivamente. A presença de glândulas na fase secretora limitada às porções jovens da planta pode ser justificada pela preferência das fêmeas de borboletas em ovipor em órgãos jovens destas espécies (Williams & Gilbert 1981) e, portanto, essencial ao recrutamento de formigas nesta região.

As diferenças quanto à sincronia no desenvolvimento dos NEF entre as espécies são dados inéditos. Sugere-se que a assincronia dos NEF de *P. alata* disponibiliza néctar por um longo período, enquanto a sincronia das glândulas de *P. edulis* oferece, aparentemente, uma maior concentração deste recurso.

Anatomia e histoquímica dos NEF e análise química do néctar

A anatomia dos NEF diferenciados apresenta semelhanças entre ambas as espécies e outras da mesma família descritas na literatura (Roth 1974, Durkee 1982, Elias 1983, Jáuregui *et al.* 2002), diferindo apenas na porção não secretora, em que a elevação das glândulas deve-se às células parenquimáticas comuns sob os tecidos nectaríferos de

ambas as espécies, e a porção crateriforme de *P. alata* às células parenquimáticas na região periférica.

Os tecidos nectaríferos dos NEF peciolares em fase secretora estão estruturados de acordo com os padrões básicos (Fahn 2000, Pacini *et al.* 2003, Nicolson *et al.* 2007) e comumente descritos em espécies de *Passiflora* (Roth 1974, Durkee 1983, Belin-Depoux 1989, Jáuregui *et al.* 2002): epiderme nectarífera múltipla, onde o néctar é liberado ao exterior provavelmente através de poros na cutícula (Krosnick, comunicação pessoal); parênquima nectarífero, composto por células especializadas que produzem o pré-néctar; tecido vascular composto majoritariamente por floema, que disponibiliza água e fotossintetizados aos tecidos secretores. A especialização dos tecidos do nectário, região secretora e epiderme modificada, e as glândulas recebendo seu próprio suprimento vascular é típico de NEF foliares que são ativos por muito tempo (Elias *et al.* 1975).

A presença dos flanges mantém o formato em paliçada das células epidérmicas (Miller 1985). Em *P. alata* e *P. edulis* foram identificados flanges que se estendem até a parede periclinal interna da primeira camada de células epidérmicas. Apesar dos trabalhos anatômicos que caracterizam glândulas peciolares relatarem a existência de uma cutícula fina (Roth 1968, 1974; Durkee 1982; Durkee *et al.* 1984; Jáuregui *et al.* 2002), a ocorrência dos flanges é inédita.

Em *P. alata* e *P. edulis*, o néctar é acumulado no espaço subcuticular formado entre a cutícula e a parede periclinal externa da epiderme; conforme a secreção procede, a cutícula se distende e torna-se fina. A distensão de cutícula evidenciada nestas espécies é relatada a todas as espécies de *Passiflora* descritas anatomicamente (Roth 1968, 1974; Durkee 1982; Durkee *et al.* 1984; Jáuregui *et al.* 2002). Estudos em desenvolvimento mostram que a liberação do néctar é realizada via poros cuticulares em espécies de *Passiflora* do subgênero *Decaloba* (Krosnick, comunicação pessoal). A liberação do néctar

pelo rompimento da cutícula foi observada nas espécies estudadas por Durkee (1982). Entretanto, a ruptura encontrada em alguns nectários processados de *P. edulis* está associada ao comportamento agressivo das formigas durante a coleta do néctar, e não foi observada em *P. alata*.

A formação da epiderme nectarífera múltipla em paliçada foi registrada em *P. alata* e *P. edulis*. A epiderme múltipla se origina por divisões periclinais das células protodérmicas (Metcalf & Chalk 1983, Evert 2006). Em glândulas, a única descrição levantada limita-se aos nectários do ciátio de *Euphorbia pulcherrima* (Schnepf 1964). Descrições de divisões periclinais na epiderme nectarífera já foram registradas em outras espécies de *Passiflora* (Roth 1974, Durkee 1982), entretanto, foram descritas apenas as divisões periclinais, não usado o termo “epiderme múltipla”.

Em *P. alata* e *P. edulis*, o parênquima nectarífero apresenta semelhanças, com aspecto compactado durante o desenvolvimento da glândula e células maiores e mais espaçadas nos NEF em fase secretora. As terminações vasculares na base do parênquima nectarífero são compostas apenas por floema. O tipo de vascularização do NEF pode variar entre gêneros ou espécies na mesma família (Fahn 1979), entretanto, em todas as glândulas peciolares de espécies de *Passiflora* já descritas a vascularização adjacente ao parênquima nectarífero consiste majoritariamente de floema (Durkee 1982, Jáuregui *et al.* 2002). Contato direto entre os elementos vasculares e as células da epiderme secretora não é observado, conforme descrito em outras espécies de *Passiflora* (Durkee 1982).

Grãos de amido são observados no parênquima subnectarífero – não secretor – em *P. alata* e constituem uma reserva de açúcares provenientes de outros órgãos da planta; esta ocorrência é inédita para NEF. A disponibilização ocorre após a quebra do amido e

sua posterior conversão em glicose, que pode ocorrer durante a noite, para eventuais coletores, ou em períodos de ausência do sol (Nicolson *et al.* 2007).

Os resultados dos testes histoquímicos indicam que o exsudato no interior das células nectaríferas é composto por açúcares e compostos fenólicos em ambas as espécies, acrescida de compostos alifáticos, flavonóides e alcalóides em *P. alata*. Desta forma, a co-ocorrência de compostos hidrofílicos e lipofílicos no interior das células nectaríferas permite classificar os NEF de *P. alata* como glândulas de secreção heterogênea. A descrição de secreção mista nos tecidos nectaríferos do NEF é inédita para a família. Em *P. edulis* e outras espécies de *Passiflora*, os NEF são hidrofílicos (Durkee 1982) e, em *P. foetida*, o exsudato das glândulas peciolares é exclusivamente lipofílico (Durkee *et al.* 1984).

Em *P. alata*, alcalóides e flavonóides estão concentrados nos tecidos nectaríferos, e apenas uma baixa concentração relativa de apigenina foi detectada no néctar, sugerindo haver uma retenção seletiva de compostos secundários pelas células produtoras do pré-néctar no NEF. Este evento já foi descrito em estudos comparativos entre a composição química do floema e do néctar em *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) e *Vigna unguiculata* (Fabaceae): nestas espécies, o néctar é menos rico em aminoácidos e ácidos orgânicos que o floema, indicando retenção seletiva de solutos nitrogenados pelos tecidos nectaríferos (Baker *et al.* 1978a, Pate *et al.* 1985). Uma possível função relacionada à retenção de compostos secundários em tecidos nectaríferos seria a diminuição da herbivoria destas glândulas. Em *P. edulis*, alcalóides e flavonóides não se acumulam nos tecidos nectaríferos dos NEF, mas estão presentes em traços no néctar, sugerindo que a concentração destes compostos no néctar e nas células nectaríferas é um efeito pleiotrópico da sua concentração no floema (Adler 2001).

Idioblastos secretores foram encontrados no parênquima nectarífero de *P. alata*. O conteúdo destas células apresentou resultado positivo para compostos alifáticos – terpenos – compostos fenólicos (incluindo flavonóides) e alcalóides, caracterizando estas células como glândulas de secreção heterogênea. Idioblastos com conteúdo possivelmente composto por taninos já foi descrito no parênquima nectarífero dos NEF convexos de *P. oerstedii* (Jáuregui *et al.* 2002). Compostos fenólicos e alcalóides provêm do floema (capítulo 3), enquanto os terpenos presentes nos idioblastos não são localizados em outros tecidos, provavelmente sintetizados nestas células. A síntese de terpenos em idioblastos é descrita em *Chamaerops humilis* (Arecaceae) (Caissard *et al.* 2004): nesta espécie, os idioblastos presentes nas folhas são os responsáveis pela liberação de voláteis que atuam na atração de polinizadores, enquanto as peças florais não estão envolvidas neste processo. Neste contexto, a morfologia crateriforme do NEF peculiar de *P. alata* disponibiliza um microambiente para a contenção de voláteis produzidos pelos idioblastos terpênicos, em função análoga à corona das flores de *Passiflora* (García *et al.* 2007). Terpenóides são os principais compostos voláteis emitidos pelas plantas em resposta à herbivoria, sinalizando a artrópodes carnívoros para predar ou parasitar os herbívoros (Pemberton & Lee 1996, Plepys *et al.* 2002, Tholl *et al.* 2004). Os idioblastos terpênicos presentes nos NEF de *P. alata* poderiam atuar na atração destes artrópodes, como ocorre em folhas de *Gossypium hirsutum*, que acumulam terpenóides voláteis nas glândulas do mesofilo ou em tricomas que atraem inimigos naturais que predam folívoros (Kasperbauer & Loughrin 2004).

A ocorrência de açúcar no exsudato foi evidenciada em campo pelo teste com a glicofita, e as análises em MS confirmaram a presença de glicose e/ou frutose e sacarose em ambas as espécies. A ocorrência de concentrações equivalentes de glicose, frutose e sacarose foi registrada nos NEF de *Turnera ulmifolia* (Elias *et al.* 1975), espécie

pertencente à Turneraceae, família circunscrita em Passifloraceae nos atuais sistemas de classificação (APG III 2009). Análises do exsudato dos NEF pertencentes a diferentes *taxa* têm demonstrado que alcalóides, compostos fenólicos e aminoácidos não-protéicos são comuns no néctar (Baker & Baker 1975, Baker *et al.* 1978b). O flavonóide apigenina foi detectado em ambas as espécies; a presença de flavonóides no néctar confere efeitos microbicidas (Verpoorte & Schripsema 1994) e ação antioxidante, atuando na conservação do néctar (Gould & Lister 2006, Nicolson *et al.* 2007). Em *P. edulis*, foram detectados os alcalóides harmana, harmina e harmalina; a presença destes compostos está relacionada à resistência a herbivoria (Adler 2001, Adler & Irwin 2005) e atração de consumidores específicos, pois o néctar dissuasivo ou tóxico para algum coletor pode não afetar outros (Stephenson 1982, Smith *et al.* 1990). As diferenças na composição do néctar, evidenciadas pelos diferentes padrões observados nos espectros de *P. alata* e *P. edulis*, podem ser explicadas por ambas as proposições sugeridas por Adler (2001): o processo secretor nos nectários de ambas as espécies deve ser diferenciado, evidenciado pela composição no conteúdo das células nectaríferas e do néctar liberado, e esta distinção provavelmente está relacionada à constituição diferenciada da solução do floema em ambas as espécies.

Fungos são encontrados na região periférica (não secretora) dos NEF em fase secretora de *P. edulis* e nas glândulas em fase pós-secretora de ambas as espécies. Alcalóides, flavonóides e terpenos são antifúngicos (Farrell *et al.* 1991, Dixon & Paiva 1995, Kutchan 2005, Otani *et al.* 2005, Treutter 2006): a ocorrência de idioblastos com conteúdo terpênico dispersos no parênquima nectarífero dos NEF de *P. alata* e metabólitos no néctar proveniente dos NEF de ambas as espécies impedem a proliferação destes microorganismos.

Cristais

A descrição de cristais nos NEF em fase meristemática de *P. alata* e *P. edulis* é inédita: os registros destas estruturas limitam-se à fase secretora destas glândulas (Durkee 1982, Durkee *et al.* 1984, Jáuregui *et al.* 2002, Thadeo *et al.* 2008). *P. edulis* apresenta cristais do tipo drusa, enquanto os resultados obtidos em *P. alata* descrevem, ineditamente, agregados cristalíferos e areia cristalífera no parênquima nectarífero de uma mesma glândula. As drusas e o agregado cristalífero apresentam composição atômica coerente com a estrutura relacionada ao oxalato de cálcio – cálcio e oxigênio (CaO_x).

A presença de cristais de oxalato de cálcio nos nectários está relacionada aos assimilados do floema (Elias & Gelband 1976): o cálcio inibe as ATPases presentes na membrana plasmática, possíveis responsáveis pelos mecanismos de transporte de açúcares; os cristais teriam a função de imobilizar este cálcio (Pascal 1993, Thadeo *et al.* 2008). Em *Glycine max*, a presença de cristais é atribuída ao seqüestro de cálcio durante o desenvolvimento do nectário, causando a formação de paredes celulares muito finas no parênquima nectarífero (Horner *et al.* 2003).

Fatores como o estado de hidratação do cristal, taxa de cálcio e oxalato, presença de substâncias nucleadoras ou contaminantes (ácidos orgânicos) e envolvimento de estruturas celulares especializadas têm papel na determinação da morfologia do cristal pelos idioblastos cristalíferos (Franceschi & Nakata 2005). Cristais do tipo drusas são descritos nas glândulas peciolares de espécies de Passifloraceae (Solereider 1908, Roth 1974, Durkee 1982, Durkee *et al.* 1984, Jáuregui *et al.* 2002).

A literatura descreve a areia cristalífera como um tipo de cristal de oxalato de cálcio (Dickison 2000, Evert 2006); entretanto, o átomo encontrado em maior abundância relativa, o ferro, permite inferir que a estrutura deste tipo de cristal não está relacionada ao

oxalato de cálcio. A proteína de armazenamento de ferro, ferritina, é amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em mamíferos, bactérias, fungos e plantas – nesta denominada fitoferritina. Em contraste com a localização citoplasmática da ferritina encontrada nos mamíferos, a fitoferritina é estritamente localizada no ou cloroplasto, atuando como uma proteína destas organelas (Mark *et al.* 1983). Este é o primeiro registro de localização de átomos de ferro fora dos plastídios, sob a forma de cristal. Uma provável função para o armazenamento de ferro sob a forma de areia cristalífera seria evitar o estresse oxidativo promovido pelo excesso de ferro nas células (Taiz & Zeiger 2009). Provavelmente, este excesso de ferro provém do xilema e uma maneira de se inviabilizar este processo seria a mobilização de ferro deste tecido sob a forma de cristal, de forma análoga aos cristais de oxalato de cálcio.

Referências¹⁰

- ADDICOTT, J.F. 1984. Mutualistic interactions in population and community processes. *In* A new ecology: novel approaches to interactive systems (P.W. Price, C.N. Slobodchikoff & B.S. Gaud, eds.). John Wiley, New York, p.437-451.
- ADLER, L.S. 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91:409-420.
- ADLER, L.S. & IRWIN, R.E. 2005. Ecological costs and benefits of defenses in nectar. *Ecology* 86:2968-2978.
- APG III 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- APPLE, J.L. & FEENER, D.H. 2001. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. *Oecologia* 127:409-416.
- ASCENSÃO, L., MOTA, L. & CASTRO, M. de M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84:437-447.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1975. Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. *In* Coevolution of animals and plants (L.E. Gilbert & P.H. Raven, eds.). University of Texas Press, Texas, p.100-132.
- BAKER, D.A., HALL, J.L. & THORPE, J.R. 1978a. A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. *New Phytologist* 81:129-137.
- BAKER, H.G., OPLER, P. & BAKER, I. 1978b. A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectaries. *Botanical Gazette* 139:322-332.

¹⁰ Apresentadas de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica.

- BELIN-DEPOUX, M. 1989. Des hydathodes aux nectaires foliaires chez les plantes tropicales. *Bulletin de la Société Botanique de France* 136:151-168.
- BENSON, W.W. 1978. Resource partitioning in passion vine butterflies. *Evolution* 32:493-518.
- BENSON, W.W., BROWN, K.S. & GILBERT, L.E. 1975. Coevolution of plants and herbivorous: passion flowers butterflies. *Evolution* 29:659-680.
- BENTLEY, B.L. 1976. Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community interhabitat differences in the reduction of herbivory damage. *Ecology* 57:815-820.
- BERNACCI, L.C., VITTA, F.A. & BAKKER, Y.V. 2003. Passifloraceae. *In* Flora fanerogâmica do estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd & A.M. Giullietti, orgs.). RiMa/FAPESP, São Paulo, v.3, p.252-256.
- BROWN, K.S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 36:427-456.
- CAISSARD, J.C., JOLY, C., BERGOUGNOUX, V., HUGUENEY, V., MAURIAT, M. & BAUDINO, S. 2004. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Development in Cell Biology* 2:1-15.
- CASTRO, M. de M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3:1273-1284.
- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. 1976. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129:167-174.
- CRANE, J. 1955. Imaginal behaviour of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydara* Hewitson, with special reference to the social use of color. *Zoologica* 40:167-196.

- CRANE, J. 1957. Imaginal behavior in butterflies of the family Heliconiidae: changing social patterns and irrelevant actions. *Zoologica* 42:135-145.
- DAVID, R. & CARDE, J.P. 1964. Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris* 258:1338-1340.
- DELL'ERBA, R., KAMINSKI, L.A. & MOREIRA, G.R.P. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Série Zoologia* 95:29-46.
- DIAS, A.C.A. 2008. Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala* L. (Polygalaceae) com ênfase nas estruturas secretoras. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DICKISON, W.C. 2000. Integrative plant anatomy. Hartcourt Academic Press, San Diego.
- DIXON, R.A. & PAIVA, N.L. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.
- DURKEE, L.T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. *American Journal of Botany* 69:1420-1428.
- DURKEE, L.T. 1983. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. *In* The biology of nectaries (B. Bentley & T. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.1-29.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71:596-602.
- ELIAS, T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. *In* The biology of nectaries (B. Bentley & T. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.174-182.

- ELIAS, T.S. & GELBAND, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63:1349-1353.
- ELIAS, T.S., ROZICH, W.R. & NEWCOMBE, L. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *American Journal of Botany* 62:570-576.
- EVERT, R.F. 2006. *Esau's Plant anatomy: meristems, cells and tissues of plant body: their structure, function and development*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31:37-75.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FRANCESCHI, V.R. & NAKATA, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56:41-71.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159.
- GARCÍA, M.T.A., GALATI, B.G. & HOC, O.S. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp (Passifloraceae). *Flora* 202:302-315.
- GERLACH, G. 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GILBERT, L.E. 1971. Butterfly-plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with heliconiine butterflies? *Science* 172:585-586.
- GILBERT, L.E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. *In* *Coevolution of animals and plants* (L.E. Gilbert & P.R. Raven, eds.). University of Texas Press, Texas, p.210-240.

- GILBERT, L.E. & SMILEY, J.T. 1978. Determinants of local diversity in phytophagous insects. *In* Diversity of insect faunas (L.A. Mound & N. Waloff, eds.). Blackwell Scientific, London, p.89-104.
- GOLDSTEIN, J., NEWBURY, D.E., JOY, D.C., LYMAN, C.E., ECHLIN, P., LIFSHIN, E., SAWYER, L.C. & MICHAEL, L.R. 1994. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Plenum Press, New York.
- GOODWIN, T.W. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press Inc., London.
- GOULD, K.S. & LISTER, C. 2006. Flavonoid function in plants. *In* Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, p.397-441.
- GROSS, J.W. 2004. Mass spectrometry – A textbook. Springer-Verlag, Berlin.
- HIGH, O.B. 1984. Lipid histochemistry. Oxford University Press, New York.
- HORNER, H.T., HEALY, R.A., CERVANTES-MARTINEZ, T. & PALMER, R.G. 2003. Floral nectary fine structure and development in *Glycine max.* L. (Fabaceae). *International Journal of Plant Sciences* 164:675-690.
- JANZEN, D.H. 1968. Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. *Behavior* 32:33-48.
- JÁUREGUI, D., GARCÍA, M. & PEREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. *Caldasia* 24:33-40.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Books, New York.
- KARAGEORGOU, P., BUSCHMANN, C. & MANETAS, Y. 2008. Red leaf color as a warning signal against insect herbivory: honest or mimetic? *Flora* 203:648-652.

- KASPERBAUER, M.J. & LOUGHRIN, J.H. 2004. Morphogenic light reflected to developing cotton leaves affects insect-attracting terpene concentrations. *Crop Ecology, Management and Quality* 44:198-203.
- KEELER, K.H. 1977. The extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 64:1182-1188.
- KEELER, K.H. 1980. The extrafloral nectaries of *Ipomoea leptophylla* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 67:216-222.
- KEELER, K.H. & KAUL, R.B. 1979. Morphology and distribution of petiolar nectaries in *Ipomoea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 66:946-952.
- KELBER, A., BALKENIUS, A. & WARRANT, E.J. 2003. Colour vision in diurnal and nocturnal hawkmoths. *Integrative and Comparative Biology* 43:571-579.
- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. *Publications of the Field Museum of Natural History* 19:1-613.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. *In* *Insect-plant interactions* (E. Bernays, ed.). CRC Press, Boca Raton, p.81-129.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica.
- KUO, J. & PATE, J.S. 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata*): morphology, anatomy and fine structure. *Planta* 166:15-27.
- KUTCHAN, T.M. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8:292-300.
- LANZA, J. 1988. Ant preferences for *Passiflora* nectar mimics that contain amino acids. *Biotropica* 20:341-344.

- LEAL, I.R., FISCHER, K., CHRISTIAN, M., TABARELLI, K. & WIRTH, R. 2006. Ant protection against herbivores and nectar thieves in *Passiflora coccinea* flowers. *Ecoscience* 13:431-438.
- LILLIE, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. McGraw Hill, New York.
- MARK, F., BRIEF, W. & HUISMAN, H.G. 1983. Phytoferritin is synthesized *in vitro* as a high-molecular-weight precursor. Studies on the synthesis and the uptake *in vitro* of the precursors of ferritin and ferredoxin by intact chloroplasts. *Biochemical Journal* 214:943-950.
- McLAIN, K.D. 1983. Ants, extrafloral nectaries and herbivory on the passion vine, *Passiflora incarnata*. *The American Midland Naturalist* 110:433-439.
- McMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1983. Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem. Clarendon Press, Oxford.
- MILLER, R.H. 1985. The prevalence of pores and canals in leaf cuticles membrane. *Annals of Botany* 55:459-471.
- MUGRABI-OLIVEIRA, E. & MOREIRA, G.R.O. 1996. Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13:929-937.
- NICOLSON, S.W., NEPI, M. & PACINI, E. 2007. Nectaries and nectar. Springer-Verlag, The Netherlands.
- O'DOWD, D.J. 1979. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia* 43:233-248.

- OTANI, M., SHITAN, N., SAKAI, K., MARTINOIA, E., SATO, F. & YAZAKI, K. 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138:1939-1946.
- PACINI, E., NEPI, M., & VESPRINI, J.L. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238:7-22.
- PASCAL, L. 1993. Production et composition des nectars extra-floraux de *Stigmaphyllon convolvuliform* et de *Passiflora glandulosa*. Comparaison avec la teneur en métabolites primaires du phloème. Premiers résultats. *Acta Botanica Gallica* 140:117-131.
- PATE, J.S., PEOPLES, M.B., STORER, P.J. & ATKINS, C.A. 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) II. Nectar composition, origin of nectar solutes and nectary functioning. *Planta* 166:28-38.
- PEARSE, A.G.E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- PEMBERTON, R.W. & LEE, J.H. 1996. The influence of extrafloral nectaries on parasitism of an insect herbivore. *American Journal of Botany* 83:1187-1194.
- PLEPYS, D., BARRA, F. & LÖFSTEDT, C. 2002. Volatiles from flowers of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae) attractive to the silver moth, *Autographa gamma* (Lepidoptera: Noctuidae). *Oikos* 99:69-74.
- RIO, M.C.S., OLIVEIRA, B.V., TOMAZELLA, D.P.T., SILVA, J.A.F. & PEREIRA, G.A.G. 2008. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches'broom disease of cacao. *Current Microbiology* 56:363-370.
- ROTH, I. 1968. Desarrollo de los nectarios extra-florales em *Passiflora foetida*. *Acta Botanica Venezuelica* 6:44-49.

- ROTH, I. 1974. Morfologia, anatomia y desarrollo de la hoja pinnada y de las glándulas marginales em *Passiflora*. Acta Botanica Venezuelica 9:398-401.
- SCHNEPF, E. 1964. Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen. 5. Teil: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cyathialnektarien von *Euphorbia pulcherrima* in verschiedenen Funktionszuständen. Protoplasma 58:193-219.
- SMILEY, J. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on caterpillar survivor. Ecology 67:516-521.
- SMITH, L.L., LANZA, J. & SMITH, G.C. 1990. Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. Ecology 71:107-115.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Clarendon Press, Oxford.
- SOUZA, L.M. 2008. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SPENCER, K.C. 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. In Chemical mediation of coevolution (K.C. Spencer, ed.). Academic Press Inc, San Diego, p.168-175.
- STEPHENSON, A.G. 1982. Iridoid glycosides in the nectar of *Catalpa speciosa* are unpalatable to nectar thieves. Journal of Chemical Ecology 8:1025-1034.
- STRUWE, G. 1972. Spectral sensitivity of single photoreceptors in the compound eye of a tropical butterfly (*Heliconius numata*). Journal of Comparative Physiology 79:196-201.
- SVEDSEN, A.B. & VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Co., New York.
- SWIHART, C.A. 1971. Colour discrimination by the butterfly, *Heliconius charitonius* Linn. Animal Behavior 19:156-164.

- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2009. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre.
- TATTINI, M., GRAVANO, E., PINELLI, P., MULINACCI, N. & ROMANI, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148:69-77.
- THADEO, M., CASSINO, M.F., VITARELLI, N.C., AZEVEDO, A.A., ARAÚJO, J.M., VALENTE, V.M.M. & MEIRA, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 95:1515-1522.
- THOLL, D., KISH, C.M., ORLOVA, I., SHERMAN, D., GERSHENZON, J., PICHERSKY, E. & DUDAREVAC, N. 2004. Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. <http://www.plantcell.org/cgi/rapidpdf/tpc.020156v1.pdf> (acesso em 04/10/2009).
- TREUTTER, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4:147-157.
- VASSILYEV, A.E. 2010. On the mechanism of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany* 105:349-354.
- VARASSIN, I.G., TRIGO, J.R. & SAZIMA, M. 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136:139-152.
- VERPOORTE, R. & SCHRIPSEMA, J. 1994. Isolation, identification, and structure elucidation of alkaloids: a general review. *In* Modern methods of plant analysis (H.F. Linskens & J.F. Jackson, eds). Springer-Verlag, Amsterdam, p.1-22.
- VOGEL, S. 1998. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. IV. Miscellaneous cases. *Flora* 193:225-248.

- WILLIAMS, K.S. & GILBERT, L.E. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science* 212:467-469.
- WIRTH, R. & LEAL, I.R. 2001. Does rainfall affect temporal variability of ant protection in *Passiflora coccinea*? *Ecoscience* 8:450-453.
- WOLLENWEBER, E. 1982. Flavonoids. *In* Flavonoids: advances and research (J.B. Harbone & T.J. Mabry, eds). Chapman and Hall, London, p.189-259.
- YODER, L.R. & MAHLBERG, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63:1167-1173.

CAPÍTULO 2

Caracterização morfológica e estrutural das glândulas foliares marginais em *Passiflora edulis* Sims e *P. alata* Curtis (Passifloraceae)

Introdução

Uma das sinapomorfias de Malpighiales é a presença de margens denteadas nas lâminas foliares (APG II 2009, Judd *et al.* 2009). Os dentes podem representar ornamentações nas margens foliares ou apresentar estruturas secretoras relacionadas à liberação do excedente hídrico da planta – hidatódios – ou ao desempenho de funções ecológicas nas plantas, como nectários extraflorais (NEF) ou glândulas lipofílicas cujo exsudato é dissuasivo (Roth 1974; Dave & Patel 1975; Belin-Depoux 1982, 1989; Durkee 1982; Durkee *et al.* 1984; Pascal 1993; Jáuregui *et al.* 2002, Wilkinson 2007). As famílias desta ordem apresentam, ainda, glândulas na margem de estípulas e na base das lâminas foliares de órgãos jovens desempenhando a função de coléteres (Solereeder 1908; Curtis & Lersten 1974, 1978; Thomas 1991; Gonzáles 1998).

Em Passifloraceae, algumas espécies de *Passiflora* possuem margem foliar denteada ou serreada, cujos dentes são referidos genericamente como ornamentações ou glândulas (Killip 1938, Koptur 1992, Bernacci *et al.* 2003), sem que estudos que identifiquem a natureza destas estruturas sejam efetuados. Esta identificação é necessária em decorrência da existência de espécies neste gênero que apresentam glândulas resiníferas ou NEF nesta posição (Durkee 1983a,b; Durkee *et al.* 1984, Jáuregui *et al.*

2002), cuja finalidade é a defesa direta ou indireta destas espécies contra folívoros, representando adaptações morfológicas para limitar o impacto negativo da herbivoria (Wäckers *et al.* 2001).

Os **NEF** estão associados à atração de formigas e, eventualmente, atraem outros predadores (Wäckers *et al.* 2001, capítulo 1); esta visitação reduz a herbivoria (O'Dowd 1979) e aumenta a aptidão reprodutiva das plantas que os possuem (Rico-Gray & Thien 1989, Oliveira 1997). Em *Passiflora*, estas glândulas se apresentam como protuberâncias sobre os pecíolos e ao longo das margens foliares, e como ocelos na face adaxial das lâminas foliares (Jáuregui *et al.* 2002). A presença destas estruturas é resultado da relação co-evolutiva entre espécies de *Passiflora* e de borboletas Heliconiini (Benson *et al.* 1975, Brown 1981, Spencer 1988).

Coléter é um termo funcional relacionado às estruturas secretoras que produzem uma substância viscosa que lubrifica e protege gemas em desenvolvimento (Fahn 1979); esta secreção pode ser composta apenas por mucilagem ou por uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas, incluindo os terpenos (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991). A mucilagem é um sistema de hidro-gel composto por água, ácido péctico e pequenas quantidades de arabinose, xilose, ramnose, açúcares redutores e ácidos orgânicos; apresenta, ainda, enzimas hidrolíticas e oxidativas – pectinesterases, poligalacturonases, agalacturonases, peroxidases e polifenoloxidasas (Gregory & Baas 1989, Cividanes *et al.* 1993).

Os coléteres podem ser equivocadamente interpretados como “nectários extraflorais” (Dave & Patel 1975, Mohan & Inamdar 1986). Em Passifloraceae *sensu lato* – atualmente circunscrevendo Turneraceae e Malesherbiaceae (APG III 2009) –, as descrições de coléteres são escassas, referindo-se à presença de tricomas na base da lâmina foliar no gênero *Passiflora* e *Malesherbia* (Solereider 1908, Thomas 1991). e, em trabalhos

recentes, emergências presentes nas estípulas e base das lâminas foliares em espécies de *Piriqueta* e *Turnera* (González 1993, 1998).

Os trabalhos que abordam a identificação e morfologia das glândulas foliares em *Passifloraceae s.l.* são escassos e restritos aos gêneros *Malesherbia*, *Passiflora*, *Piriqueta* e *Turnera*. A tabela 1 apresenta uma síntese das espécies de *Passiflora* em que glândulas presentes nos órgãos vegetativos aéreos foram identificadas.

Tabela 1. Estudos morfológicos e/ou ultra-estruturais realizados em glândulas de espécies de *Passiflora* sp. (subgêneros segundo Müschner *et al.* 2003). H: hidatódio; GR: glândula resinífera; NEF: nectário extrafloral.

Subgêneros	espécies	estruturas secretoras descritas	referências bibliográficas
<i>Decaloba</i>			
	<i>P. biflora</i>	NEF	Durkee 1982, Durkee 1983b
	<i>P. cuneata</i>	NEF e H	Roth 1974
	<i>P. helleri</i>	NEF	Durkee 1982
	<i>P. kahlbreyeri</i>	NEF	Roth 1974
	<i>P. suberosa</i>	NEF	Roth 1974, García <i>et al.</i> 2000, Jaurégui <i>et al.</i> 2002
	<i>P. tuberosa</i>	NEF	Jaurégui <i>et al.</i> 2002
	<i>P. warmingii</i>	NEF	Durkee 1982; Durkee 1983a, 1983b
<i>Passiflora</i>			
	<i>P. amethystina</i>	NEF	Rocha <i>et al.</i> 2009
	<i>P. caerulea</i>	NEF	Durkee 1983b, Garcia <i>et al.</i> 2000
	<i>P. foetida</i>	NEF e GR	Roth 1968, 1974; Durkee <i>et al.</i> 1984; Jaurégui <i>et al.</i> 2002
	<i>P. incarnata</i>	NEF	Elias 1983
	<i>P. ligularis</i>	NEF	Durkee 1982
	<i>P. oerstedii</i>	NEF	Jaurégui <i>et al.</i> 2002
	<i>P. quadrangularis</i>	NEF	Durkee 1982
	<i>P. seemanii</i>	NEF	Durkee 1982

Diante da diversidade de estruturas secretoras que podem ocorrer nas ornamentações das margens foliares em espécies de Malpighiales, evidenciar as principais classes de compostos sintetizadas possibilitará a identificação destas glândulas, esclarecimento este essencial a futuros estudos relativos às famílias desta ordem.

Objetivos

O presente trabalho tem o propósito de caracterizar a morfologia e estrutura anatômica das glândulas foliares marginais de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims – ambas do subgênero *Passiflora* (Müschner *et al.* 2003).

Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de açúcares no exsudato pelo uso de tiras de identificação de glicose (glicofita) e efetuar registros fotográficos dos eventuais coletores;
- Realizar um estudo morfológico e ontogenético com o escopo de verificar a origem e estrutura destas glândulas;
- Verificar a natureza química do material sintetizado pelas glândulas através de testes histoquímicos convencionais;
- Identificar compostos químicos de massas conhecidas – açúcares e compostos bioativos – no exsudato produzido nestas glândulas.

Materiais e Métodos

Em campo

Indivíduos de *P. alata* e *P. edulis* foram coletados pela manhã no CPQBA (Paulínia, SP), disponibilizados pelo Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães, e identificados pelo especialista Dr. Luis Bernacci do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O material testemunha de cada espécie foi providenciado e incluído no Herbário UEC. Dados referentes ao material testemunha são apresentados a seguir: *P. edulis* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 24-XI-2008, *P.R. Cardoso* 2 (UEC 111509); *P. alata* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 25-VII-2009, *P.R. Cardoso* 3 (UEC 145620).

Os aspectos morfológicos da ontogênese das glândulas marginais foram registrados de dois indivíduos sombreados e dois expostos à luz solar de ambas as espécies. As bases dos ramos vegetativos foram isoladas com graxa inócua “Tanglefoot” para evitar a

remoção do exsudato pela fauna associada; na manhã seguinte ao isolamento dos ramos, as glândulas cuja secreção era profusa foram testadas com glicofita (Keeler & Kaul 1979, Dias 2008) e o exsudato coletado para análises químicas posteriores.

Observações e registros fotográficos foram realizados no período da manhã para verificar se o exsudato produzido pelas glândulas marginais provia recursos à fauna associada. Fotos de formigas foram enviadas ao Prof. Dr. Carlos Roberto Brandão (Museu de Zoologia, USP) para identificação. O registro fotográfico dos aspectos relevantes foi obtido com a câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-H1 e as imagens (600 dpi) editadas no programa Photoshop 7.0 para elaboração das pranchas.

O material botânico coletado para as análises micromorfológicas e anatômicas consistiu de ápices caulinares vegetativos e folhas dos sete nós visíveis subsequentes de plantas sadias.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Peças fixadas em FAA (Johansen 1940) e Karnovsky (Kraus & Arduin 1997) de um indivíduo de cada espécie foram isoladas, desidratadas em série etílica ascendente, secas pelo método de ponto crítico e metalizadas com ouro coloidal (Ascensão *et al.* 1999, modificado). As observações e captura de imagens (600dpi) foram realizadas em microscópio JEOL JSM 5000LV a 20kV, do Instituto de Química/Unicamp, e as imagens editadas no programa Photoshop 7.0.

Estudos estruturais e histoquímicos

Ramos vegetativos aéreos de dois indivíduos de cada espécie foram fixados em FAA (Johansen 1940) por 24h para preservar compostos hidrofílicos; em formalina neutra tamponada (FNT; Lillie 1965) por 48h para os compostos lipofílicos; e em sulfato ferroso

em formalina (SFF; Johansen 1940) por 48h para a localização *in situ* de compostos fenólicos totais (Castro & Demarco 2008).

As glândulas marginais foram isoladas; o material foi desidratado em série butílica ascendente (álcool butílico terciário, Johansen 1940) e incluído em parafina. Os cortes seriados obtidos foram corados com safranina e azul de astra (Gerlach 1969) e tripla coloração de Flemming (Johansen 1940) para estudos estruturais, e as lâminas montadas em resina sintética. A observação de cristais foi realizada sob luz polarizada.

Testes histoquímicos foram aplicados em material fresco e fixado proveniente de um indivíduo de cada espécie. Os ensaios foram procedidos nas glândulas em fase secretora para a localização *in situ* das principais classes de compostos químicos que constituem a secreção: reação PAS para a localização de grupos 1,2-glicol presentes em polissacarídeos totais (McManus 1948, Jensen 1962), vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico/cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973), preto de Sudão B para compostos alifáticos (Pearse 1985), flavonóides (Charrière-Ladreix 1976, Wollenweber 1982, Tattini *et al.* 2000) e aminas terciárias e quaternárias presentes em alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Svedsen & Verpoorte 1983). Os tratamentos estão citados na tabela 2.

O controle dos testes hidrofílicos foi procedido de acordo com as respectivas técnicas; aos testes lipofílicos foi realizada a extração prévia dos compostos alifáticos pela solução composta por clorofórmio/metanol/água/ácido clorídrico (66:33:4:1 v/v; High 1984) e posterior fixação em FNT (Lillie 1965). O controle dos testes para detecção de alcalóides foi efetuado pelo tratamento prévio das peças com ácido tartárico 5% (Svedsen & Verpoorte 1983).

Observações sob fluorescência na banda do UV foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 equipado com lâmpada de mercúrio (HBO 100W) e filtro bloqueador BA420 (filtro de excitação BP330-385 e espelho dicromático DM400).

Os aspectos relevantes foram registrados através de imagens (600dpi) obtidas na câmera digital DP71 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX51 e em filme Pro Image Kodak 100, e os negativos digitalizados. As escalas foram obtidas pela projeção da lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas. As imagens foram editadas no programa Photoshop 7.0 para a elaboração das pranchas.

Análise química do néctar – espectrometria de massas (MS)

O exsudato proveniente de diferentes glândulas de ambas as espécies foi coletado com microcapilares, agrupados e armazenados em tubos *ependorff* a -10°C (Thadeo *et al.* 2008).

A análise das amostras foi realizada em triplicata. A alíquota de $10\mu\text{l}$ do exsudato foi solubilizada na concentração de $50\mu\text{g/ml}$ em água: metanol (7:3, v:v) contendo 5mmol/l de cloreto de sódio ou potássio (Souza 2008).

As amostras foram aplicadas por injeção direta em dois equipamentos distintos: os espectros 49-55 foram obtidos no espectrômetro de massas Q-TOF Micromass Waters; o espectro 56 no espectrômetro de massas Thermofischer Scientific High Resolution Mass Spectrometer 7.2 Tesla, FT-LQT-MS Ultra. As condições de análises foram as mesmas em ambos os espectrômetros: temperatura de dessolvatação a 100°C em que o nitrogênio foi usado como gás de nebulização e dessolvatação; capilar de 3000V; cone de 40V. A detecção foi feita em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica. As análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo; a aquisição e processamento dos espectros foram realizados com o *software* Excalibur 2.0 SR1™.

O processamento e análise das amostras foram realizados no laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, no Instituto de Química/Unicamp, sob a supervisão e auxílio da Dra. Alexandra C.H.F. Sawaya e Msc. Nathalia Luiza Andreazza.

Resultados

Dados macromorfológicos e observações de campo (figuras 1-6)

P. edulis – NEF laminares

As glândulas estão presentes ao longo da margem serrada das lâminas foliares trilobadas, possuem tamanho semelhante – exceto as interlobais, que são maiores (figuras 1,2) –, e estão dispostas simetricamente em relação ao feixe vascular principal. Os ramos isolados com graxa inócua apresentam exsudato profuso sobre a glândula (figura 2), positivo com a glicofita e coletado por formigas do gênero *Camponotus* (figura 3).

P. alata –NEF laminares

As glândulas estão presentes nas margens denteadas da lâmina foliar desde a região mediana até a base do limbo (figura 4). O resultado com a glicofita foi positivo e formigas coletando o exsudato não foram observadas.

Em ambas as espécies, o número de NEF laminares é variável nos nós subseqüentes de um mesmo indivíduo. Os NEF laminares iniciam a fase secretora antes dos peciolares, no primeiro nó visível, e cessam sua atividade no segundo ou terceiro nó visível.

P. alata – glândulas estipulares

As estípulas estão distribuídas aos pares em cada nó do ramo e apresentam três a seis glândulas marginais dispostas desde a região mediana até a sua base (figura 5). As glândulas estão ativas apenas nas estípulas presentes no ápice caulinar vegetativo e o exsudato profuso é visível sobre as glândulas mesmo nos ramos não isolados com graxa (figuras 5,6). O resultado obtido com a glicofita foi negativo e formigas coletando o exsudato não foram observadas. As glândulas inativas, assim como as estípulas, tornam-se cada vez menos conspícuas nos nós subseqüentes.

Dados micromorfológicos, ontogenéticos e histoquímicos (figuras 7-48)

Ontogênese das glândulas foliares marginais em MEV (figuras 7-20)

A fase meristemática das glândulas foliares marginais é evidenciada pelo surgimento de protuberâncias que emergem do ápice para a base nas lâminas foliares em ambas as espécies (diferenciação basípeta; figuras 7-9,13-14) e da base para o ápice nas estípulas de *P. alata* (diferenciação acrópeta; figuras 17-18). As protuberâncias aumentam em volume até adquirirem um formato arredondado, característico da fase pré-secretora (figuras 10,15-16,19).

A assincronia no desenvolvimento basípeta das glândulas foliares marginais é evidente sob MEV (figuras 7,13-16). Os NEF laminares de *P. edulis* encontram-se em diferentes fases ontogenéticas de acordo com a região observada: o terço apical é o primeiro a iniciar o seu desenvolvimento, seguido do terço mediano e, posteriormente, do basal (figura 7); entre as glândulas há o encurvamento da lâmina foliar em direção à face abaxial (figura 8).

A fase secretora é identificada pela distensão da cutícula na região central dos NEF e das glândulas estipulares (figuras 11,12,20). Os NEF laminares interlobais de *P. edulis* apresentam fungos predominantemente na região não secretora (figura 12).

Ontogênese das glândulas foliares marginais em microscopia óptica (figuras 21-48)

Inicialmente, o desenvolvimento das glândulas foliares marginais é concomitante ao desenvolvimento dos primórdios foliares (figura 21) e estipulares, no entanto, as glândulas se diferenciam e tornam-se ativas antes do pleno desenvolvimento dos órgãos que as portam.

A formação destas glândulas envolve a atividade dos três meristemas primários. No início do desenvolvimento, divisões celulares periclinais e anticlinais na protoderme (figura 22) e em diversos planos no meristema fundamental originam protuberâncias nas margens, que variam de posição de acordo com o órgão em que se localizam (figuras 22-26,42).

Protoderme – estas células diferenciam-se radialmente, do centro para a periferia da glândula; as divisões periclinais ocorrem no centro da glândula (figuras 22,23,42); a cutícula fina é observada a partir desta fase (figura 25).

Meristema fundamental – a diferenciação do parênquima secretor é iniciada antes do parênquima fundamental (figuras 24-26,42).

Procâmbio – as glândulas recebem um cordão procambial do primórdio foliar (figuras 24,25) ou estipular.

A assincronia no desenvolvimento das glândulas foliares é observada a partir desta fase: na secção da região mediana da lâmina foliar de *P. edulis*, o NEF presente na porção superior está no final da fase meristemática, enquanto os inferiores ainda iniciam esta fase (figura 26).

Fase pré-secretora

Epiderme – as divisões periclinais iniciadas na fase meristemática culminam com a formação da epiderme secretora múltipla em paliçada (figuras 29,30-32,34,43).

Tecido secretor e fundamental – ambos ainda estão em diferenciação e apresentam células compactadas; o parênquima secretor é distinto pela presença de células maiores; os cristais estão dispostos em ambos os parênquimas (figuras 32,33).

Tecido vascular – a vascularização das glândulas foliares provém das nervuras foliares e estipulares, e limita-se ao parênquima secretor destas estruturas; o contato entre os elementos vasculares e a epiderme secretora é inexistente (figuras 32,43). As terminações vasculares consistem de xilema e floema. Elementos de vaso, identificados pela placa de perfuração, foram identificados nas glândulas foliares marginais de *P. alata* (figuras 35,36); as paredes celulares dos elementos traqueais apresentam espessamentos de parede helicoidal (figuras 35-38,41) a reticulado.

Novamente, a assincronia no desenvolvimento basípeto das glândulas é evidenciada: em *P. alata*, enquanto o NEF inferior está na fase pré-secretora, o superior está na secretora, evidenciada pela cutícula distendida (figura 31).

A fixação em FAA preserva os compostos hidrofílicos presentes no interior das células da epiderme e parênquima secretores das glândulas marginais (figuras 29,30-32,34,43).

Os NEF interlobais presentes na lâmina foliar de *P. edulis* possuem estrutura semelhante aos peciolares desta espécie: epiderme nectarífera múltipla em paliçada composta por três camadas de células justapostas; parênquima secretor formado por cinco camadas celulares; terminações vasculares compostas majoritariamente por floema; parênquima fundamental destituído de grãos de amido; cristais dispersos nos parênquimas secretor e fundamental (figuras 29,30).

Ao final desta fase, todos os tecidos dos NEF laminares e glândulas estipulares estão diferenciados.

Fase secretora e histoquímica dos NEF laminares e coléteres estipulares

Esta fase é identificada pela distensão da cutícula (figuras 27,28,31,39-41,44-48) e liberação do exsudato no espaço subcuticular (figuras 27,40,41,45,46), delimitado entre a cutícula e a parede periclinal externa das células epidérmicas.

Epiderme – apresenta cutícula fina e flanges cuticulares que se estendem até a parede periclinal interna da primeira camada de células (figura 28). Estômatos ou rompimento da cutícula para a liberação do exsudato não são observados. A epiderme secretora múltipla em paliçada é composta por células justapostas, citoplasma denso, grande vacúolo e apenas um núcleo na região mediana da célula (figuras 39,40,44,45).

Os NEF laminares de *P. alata* apresentam alta afinidade com a safranina, até o início da fase secretora; as regiões que liberam o néctar perdem a afinidade por este corante e passam a apresentar maior afinidade com o azul de astra (figura 39).

Tecido secretor e fundamental – o parênquima secretor das glândulas marginais é composto por até quatro camadas celulares; as células do parênquima secretor e fundamental não são facilmente distintas, sendo identificadas e separadas pelas terminações vasculares sob o parênquima secretor; as células parenquimáticas secretoras são volumosas e apresentam paredes finas, núcleo proeminente e citoplasma menos denso quando comparado à epiderme secretora (figuras 40,45).

Tecido vascular – apresenta as mesmas características descritas na fase pré-secretora (figuras 41,45).

Os resultados da localização *in situ* dos compostos químicos presentes no interior das células secretoras e no espaço subcuticular (figuras 27,41,46) dos NEF laminares e coléteres estipulares de ambas as espécies estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultado dos testes histoquímicos procedidos nas glândulas foliares marginais de *P. edulis* e *P. alata*.

Tratamentos (referências)	Compostos (identificados)	Cor (resultado positivo)	Glândulas foliares		
			<i>P. edulis</i> NEF laminares (figuras)	<i>P. alata</i> NEF laminares (figuras)	Coléteres estipulares (figuras)
reação PAS (McManus 1948, Jensen 1962)	grupos 1,2-glicol presentes em polissacarídeos totais	magenta	+	+	+
			(27)	(41)	(46)
vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989)	mucilagens ácidas	vermelho	-	-	+
					(47)
ácido tânico/cloreto férico (Pizzolato & Lillie 1973)	mucilagem	preto	-	-	+
					(48)
preto de Sudão B (Pearse 1985)	compostos alifáticos	azul a preto	-	-	-
			(28)		
SFF* (Johansen 1940)	compostos fenólicos totais	marrom a preto	-	-	-
reagente natural A e cloreto de alumínio (Charrière-Ladreix 1976, Wollenweber 1982, Tattini <i>et al.</i> 2000)	flavonóides	amarelo esverdeado em UV**	-	-	-
reagentes Dragendorff e Wagner (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Svedsen & Verpoorte 1983)	aminas terciárias e quaternárias presentes em alcalóides	marrom avermelhado	-	-	-

Notas: *fixador; **330-390nm; +, resultado positivo; -, resultado negativo.

O teste com o corante preto de Sudão B identificou apenas a cutícula e os flanges cuticulares das glândulas foliares marginais (figura 28). As células secretoras destas glândulas são destituídas de compostos lipofílicos, compostos fenólicos totais, flavonóides e alcalóides.

Análises químicas qualitativas dos exsudato dos NEF laminares e coléteres estipulares (figuras 49-56)

P. edulis – NEF laminares

Açúcares – glicose e/ou frutose¹ e sacarose são detectadas no espectro *full scan* do néctar (figura 49).

Compostos bioativos – os flavonóides apigenina, orientina ou isoorientina e o alcalóide harmana são detectados nos espectros referentes aos intervalos de razão massa/carga (*m/z*) do néctar (figuras 50-52).

P. alata – NEF laminares

Açúcares – glicose e/ou frutose e sacarose são detectadas no espectro *full scan* do néctar (figura 53).

Compostos bioativos – o flavonóide apigenina e o alcalóide harmana são detectados nos espectros referentes aos intervalos de razão massa/carga (*m/z*) do néctar (figuras 54-55).

P. alata – coléteres estipulares

Açúcares – ramnose e/ou xilose, ácido galacturônico e galactose ou glicose são detectados no espectro *full scan* do exsudato (figura 56).

¹ A técnica aplicada não diferencia isômeros.

A diferença nas massas correspondentes à glicose, frutose ou galactose ($MM^2=180\text{g/mol}$), sacarose ($MM=342\text{g/mol}$), ramnose ou xilose ($MM=150\text{g/mol}$), ácido galacturônico ($MM=194\text{g/mol}$), apigenina ($MM=270\text{g/mol}$), orientina ou isoorientina ($MM=432\text{g/mol}$), e harmana ($MM=189\text{g/mol}$), decorrem da ligação destes compostos com íons hidrogênio ($MM=1\text{g/mol}$), sódio ($MM=23\text{g/mol}$) ou potássio ($MM=39\text{g/mol}$).

Ilustrações

² Massa molar.

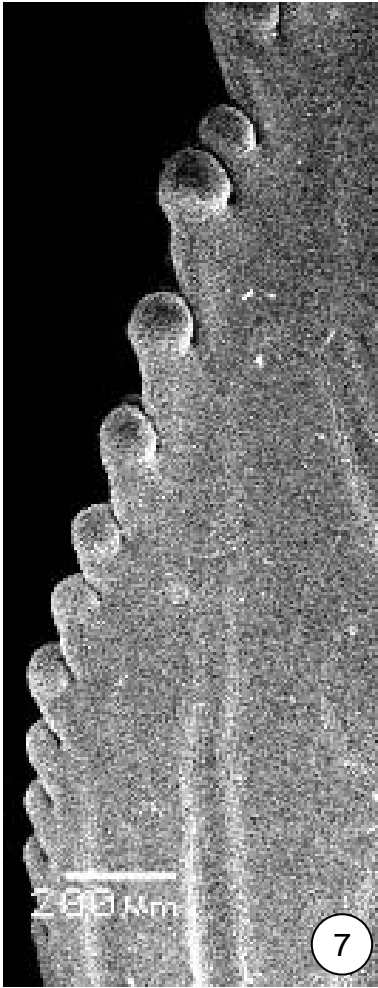
Figuras 1-3. NEF laminares em *Passiflora edulis* Sims. 1. Glândulas em toda a extensão da margem serreada dos lobos da lâmina foliar. 2. Exsudato profuso nos NEF interlobais. 3. Formiga do gênero *Camponotus* coletando néctar. Barras: 1cm.



Figuras 4-6. Glândulas marginais em *Passiflora alata* Curtis. 4. NEF laminares (seta). 5,6. Glândulas estipulares; notar secreção profusa (6). 4-6. As glândulas estão dispostas desde a região mediana até a base da margem denteada da lâmina foliar (4) e estípulas (5,6). Barras: 1cm.



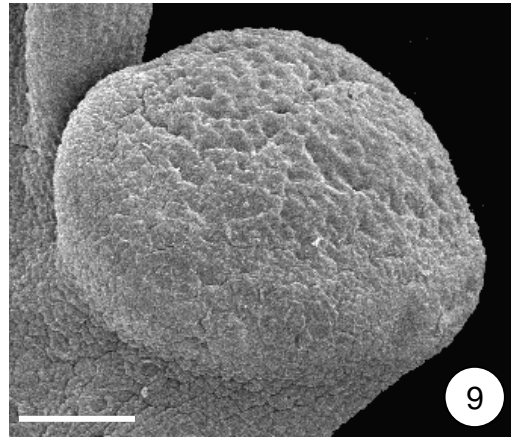
Figuras 7-12. Ontogênese dos NEF laminares de *Passiflora edulis* Sims em MEV. 7,8. Diferenciação basípeta; face adaxial (7) e abaxial (8). 9. Fase meristemática. 10. Fase pré-secretora; formato globular do NEF. 11,12. Fase secretora: notar cutícula distendida. Barras: 200 μ m (8), 50 μ m (9-12).



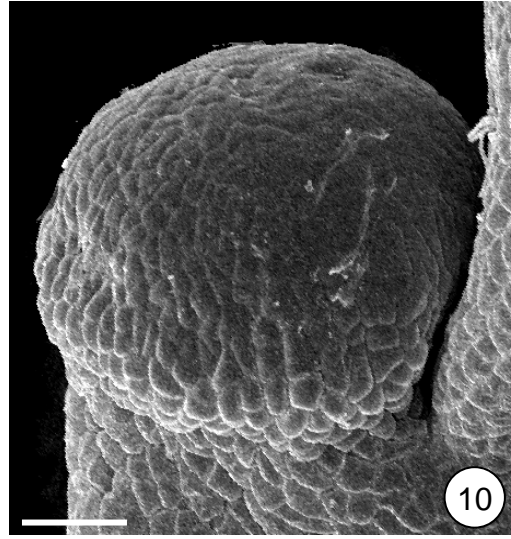
7



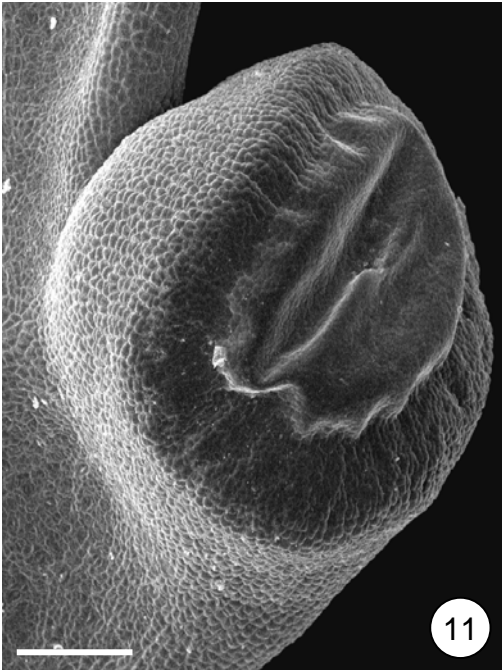
8



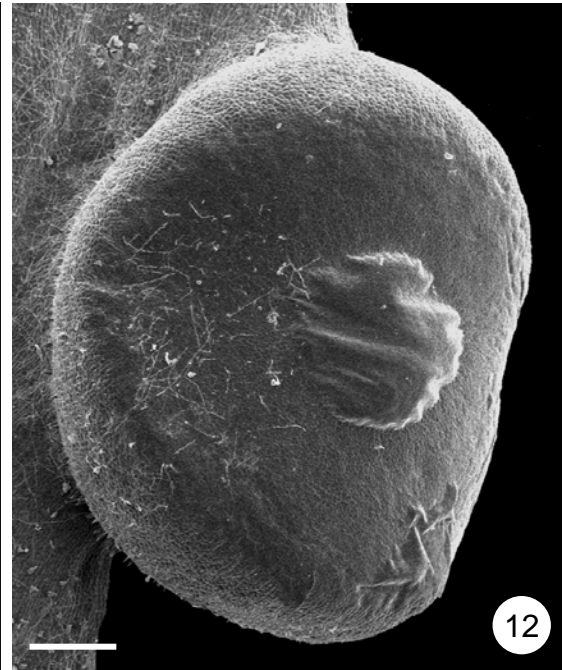
9



10

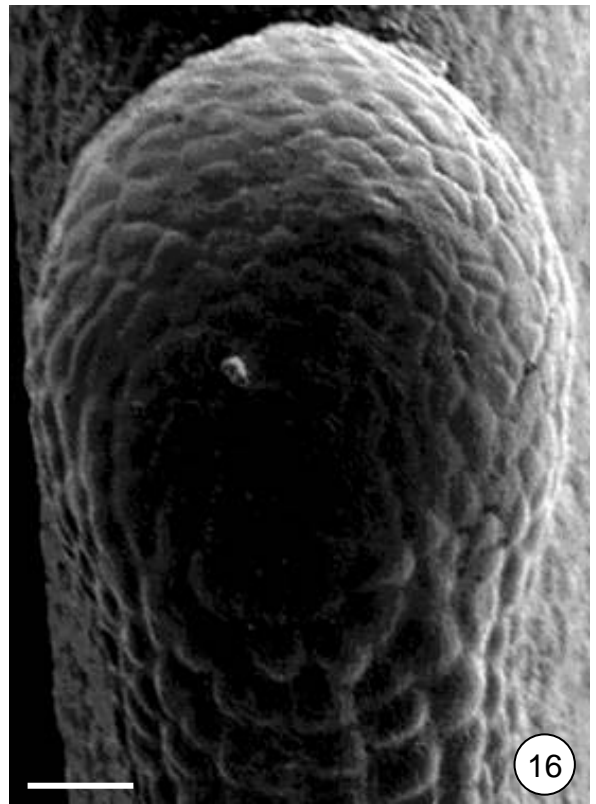
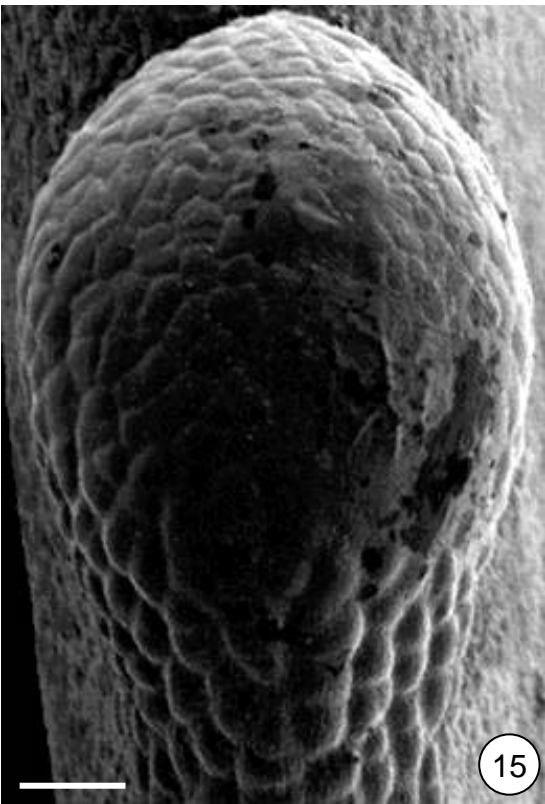
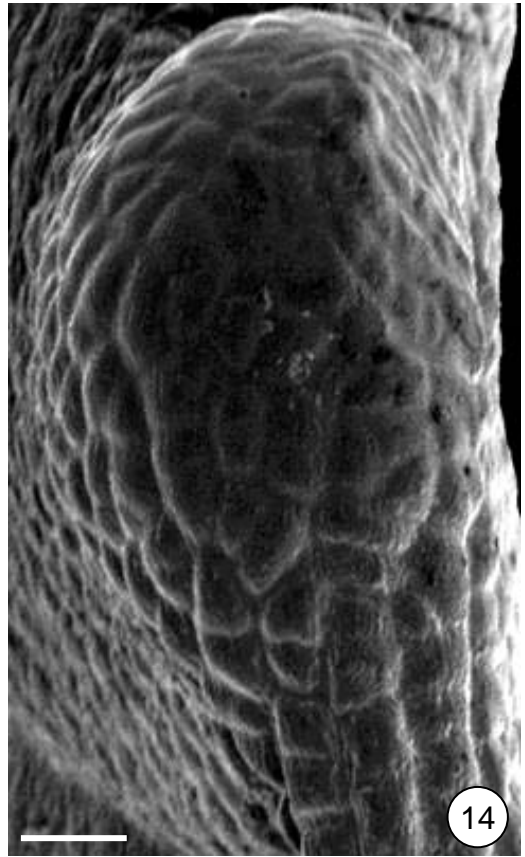
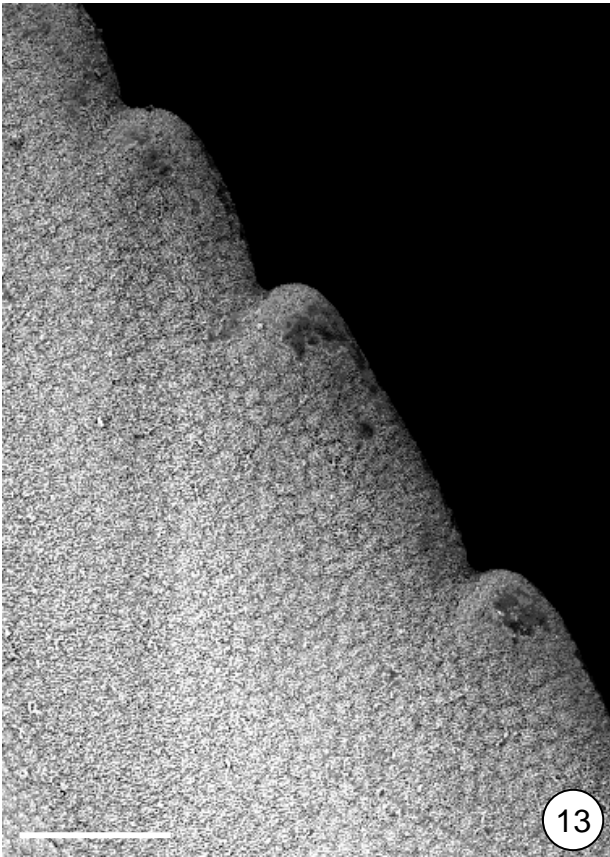


11

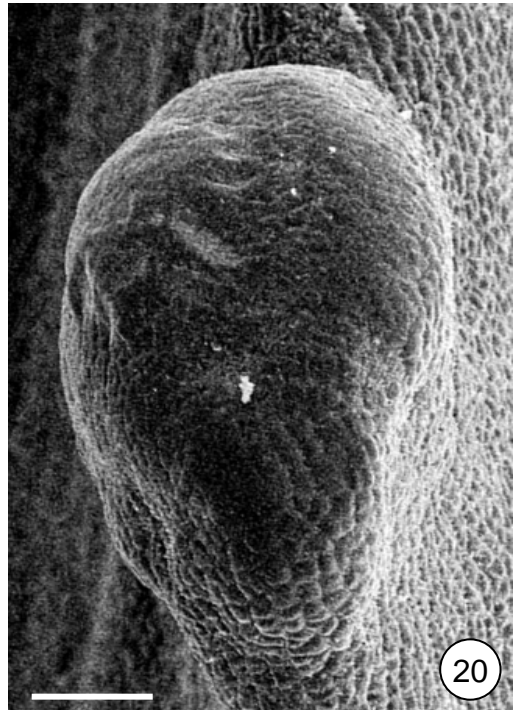
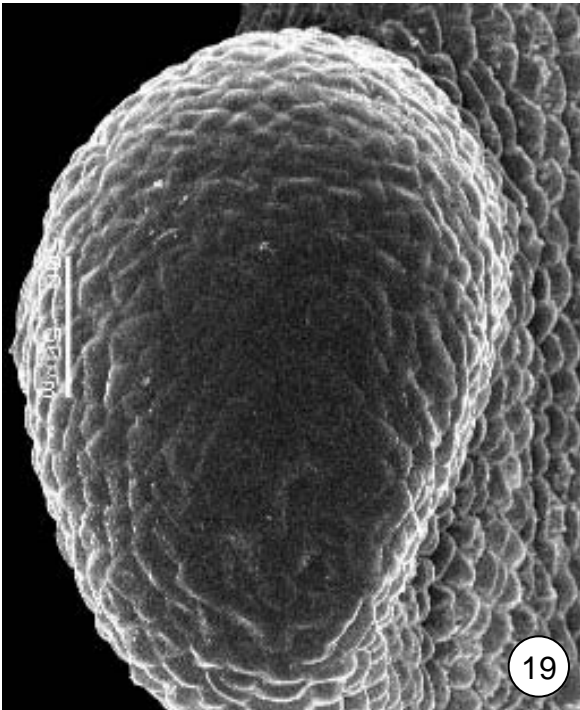
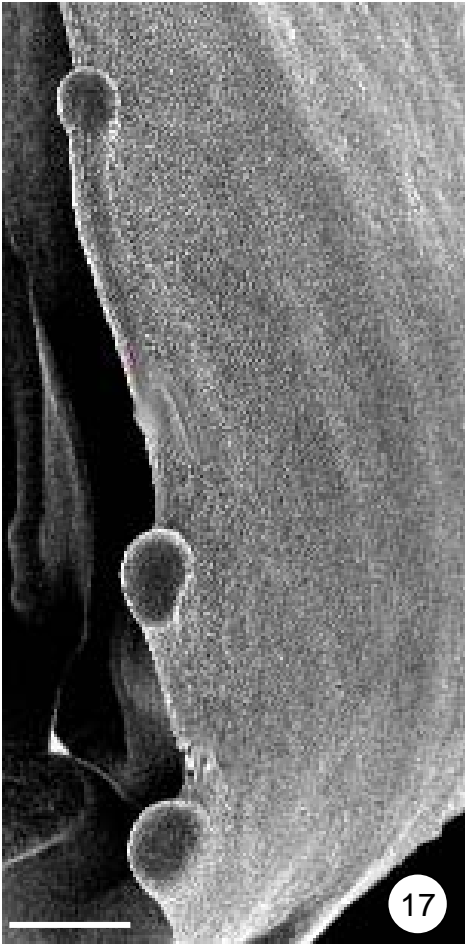


12

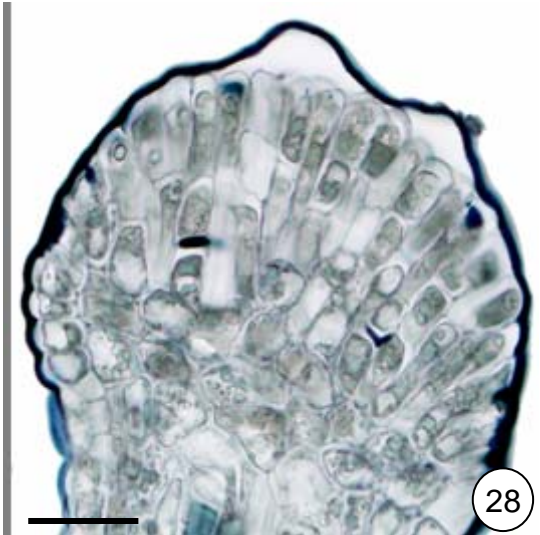
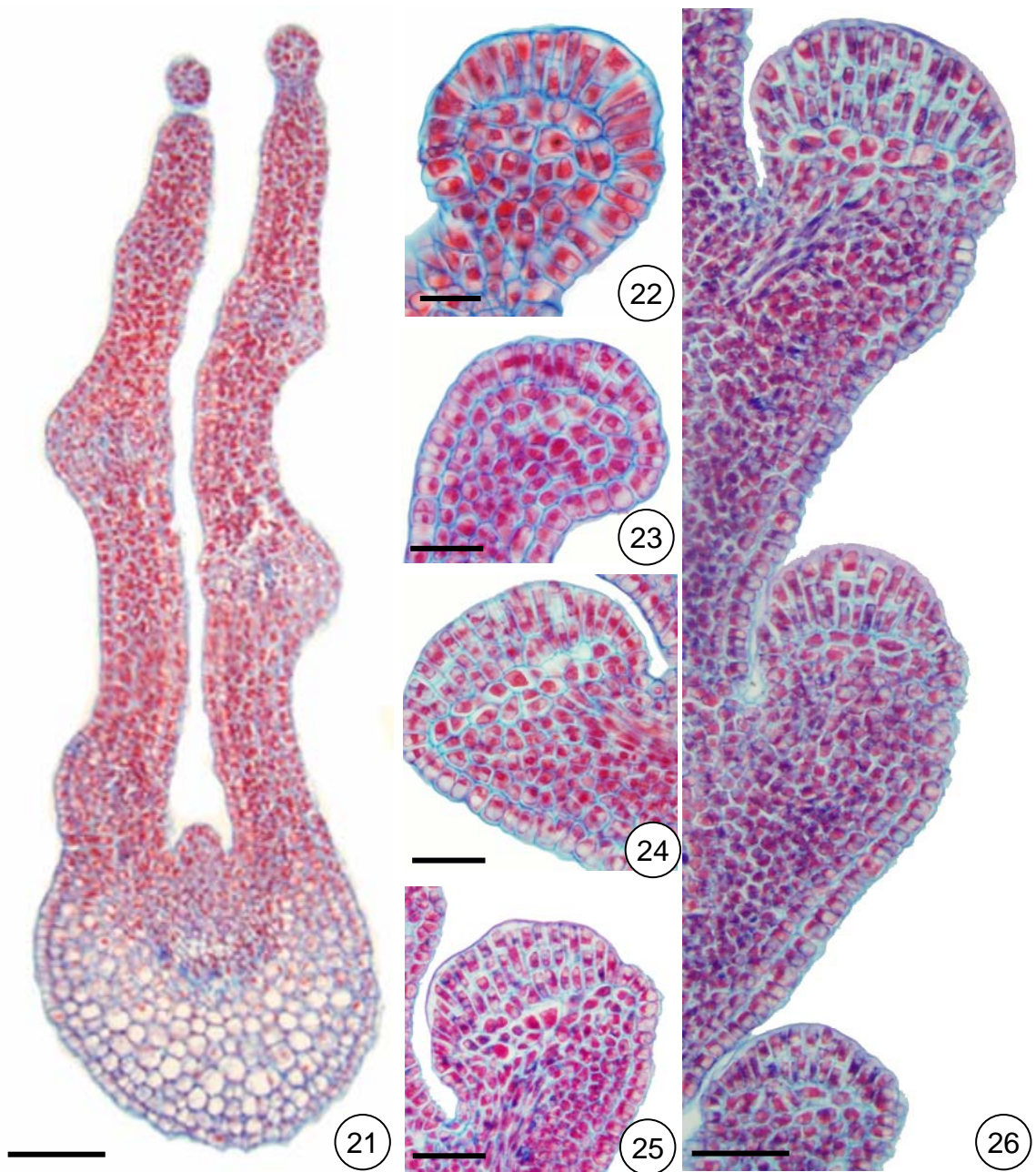
Figuras 13-16. Ontogênese dos NEF laminares de *Passiflora alata* Curtis em MEV. 13. Fase meristemática. 14-16. Diferenciação basípeta: NEF em fase meristemática na base da lâmina foliar (14) e glândulas subseqüentes no início da fase pré-secretora (15,16); notar formato globular. Barras: 500µm (13), 100µm (14-16).



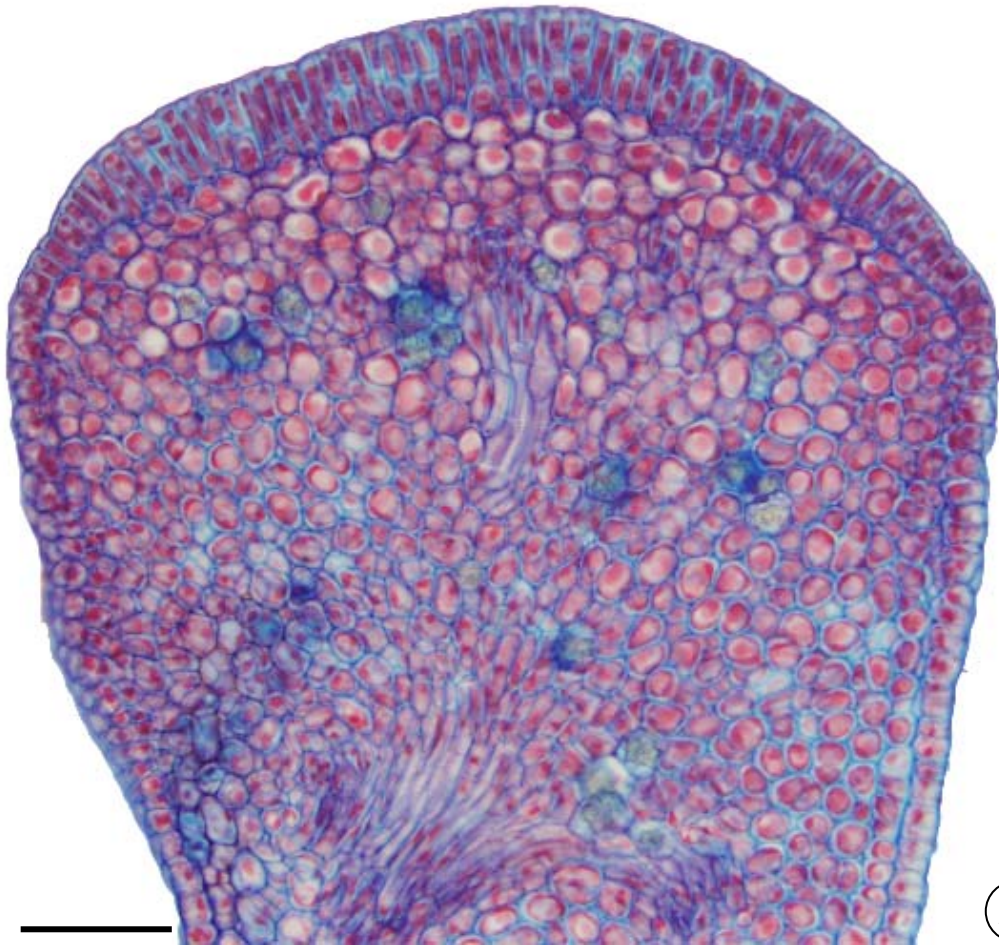
Figuras 17-20. Ontogênese das glândulas estipulares de *Passiflora alata* Curtis em MEV. 17,18. Fase meristemática: notar diferenciação acrópeta das glândulas em estípulas do primeiro (17) ao terceiro nó visível (18). 19. Fase pré-secretora; glândulas de formato globular. 20. Fase secretora; notar a cutícula distendida. Barras: 500µm (17,18), 100µm (20).



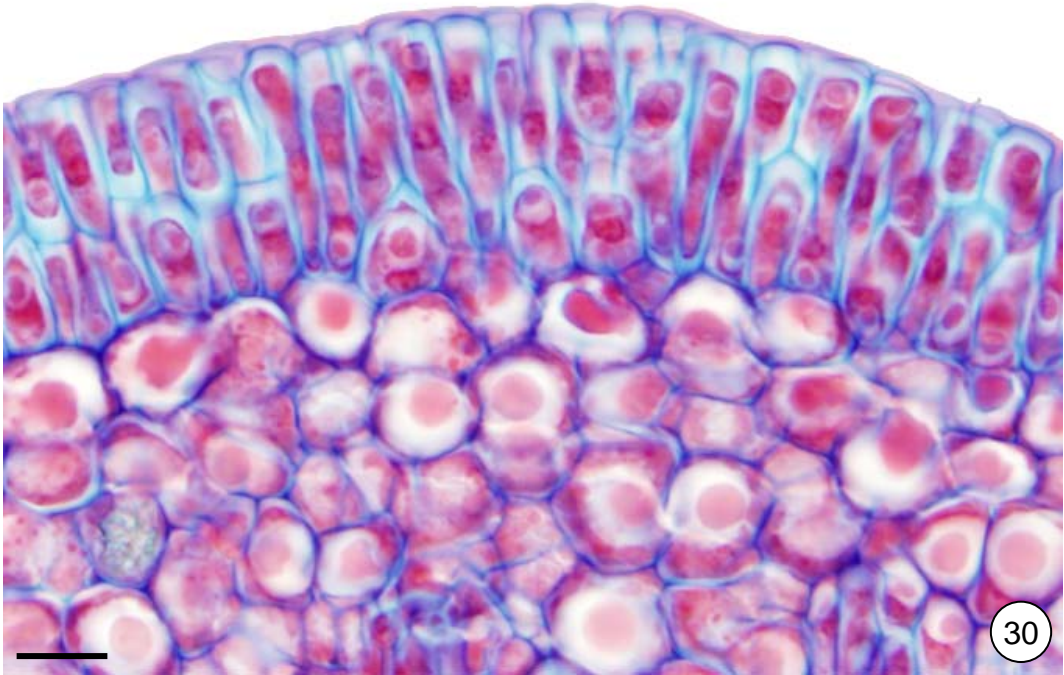
Figuras 21-28. Ontogênese, estrutura e histoquímica dos NEF laminares de *Passiflora edulis* Sims. Secções transversais (21,22) e longitudinais (23-28). 21-26. Fase meristemática a pré-secretora. 21,22. NEF no primórdio foliar (21) e divisões peri e anticlinais na protoderme (22). 23-25. Formação da epiderme secretora múltipla em paliçada; meristema fundamental em divisão (23) e diferenciação (24); notar cordão procambial (24,25). 26. NEF subseqüentes: notar diferenciação basípeta. 27,28. Fase secretora. 27. Reação PAS; secreção profusa. 28. Preto de Sudão B: cutícula íntegra distendida. Barras: 150 μ m (21,26), 50 μ m (23-25,27,28), 30 μ m (22).



Figuras 29-30. NEF laminar interlobal de *Passiflora edulis* Sims. Secções longitudinais. Fase pré-secretora, notar pré-néctar no interior das células do parênquima secretor preservado pelo FAA; terminações vasculares compostas majoritariamente por floema (29); epiderme secretora múltipla em paliçada (30). Barras: 75µm (29), 50µm (30).

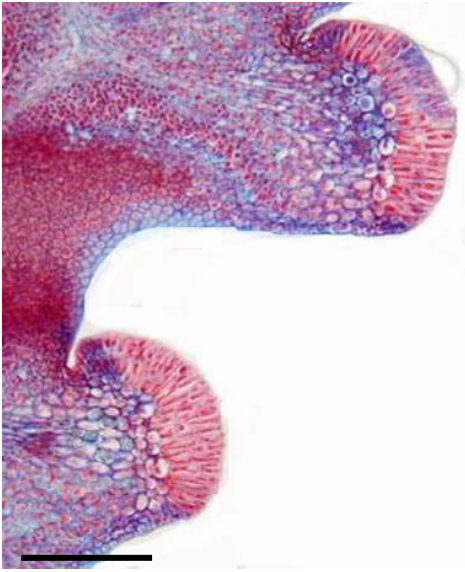


29

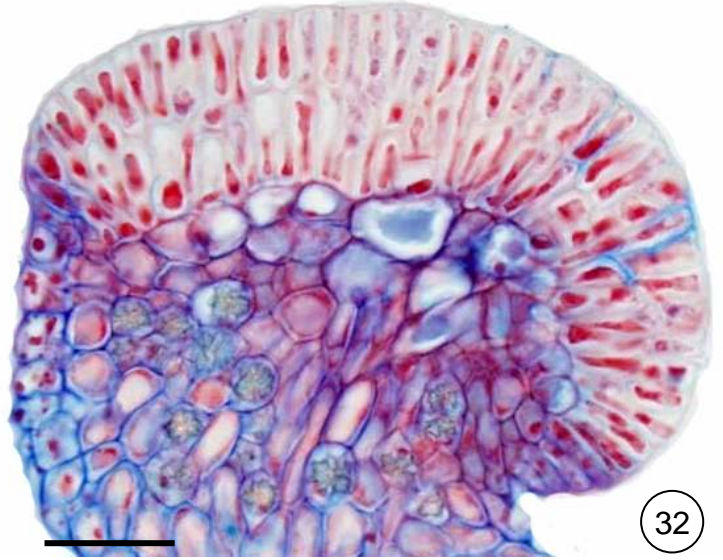


30

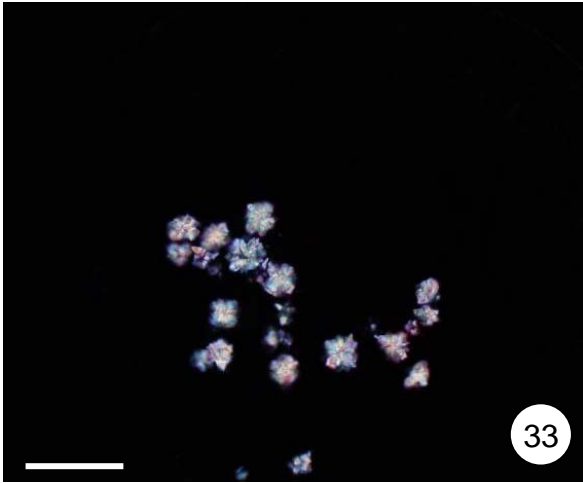
Figuras 31-36. Ontogênese e estrutura dos NEF laminares de *Passiflora alata* Curtis. Secções longitudinais. 31. NEF subseqüentes em fase secretora e pré-secretora; notar diferenciação basípeta. 32-36. Fase pré-secretora. 32-34. Epiderme secretora múltipla em paliçada apresenta intensa afinidade com a safranina (32,34); notar cristais dispersos no parênquima secretor (32,33). 35,36. Vascularização do NEF: terminações de floema sob o parênquima secretor e elemento de vaso identificado pela placa de perfuração (36). Barras: 75µm (31), 50µm (32,33,35), 30µm (34), 10µm (36).



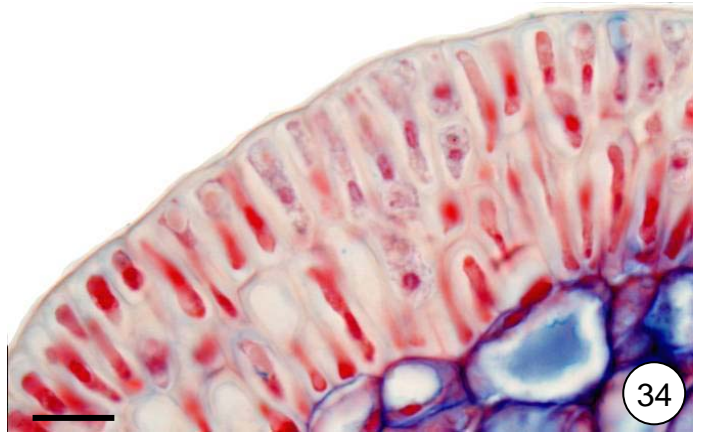
31



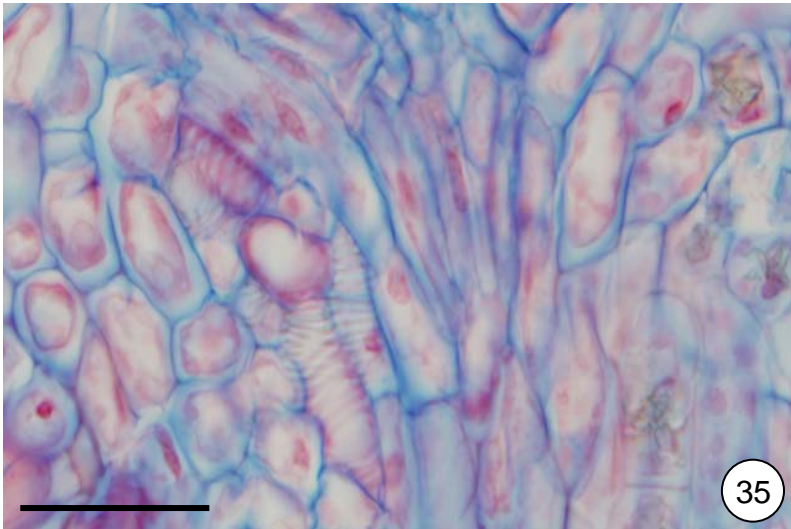
32



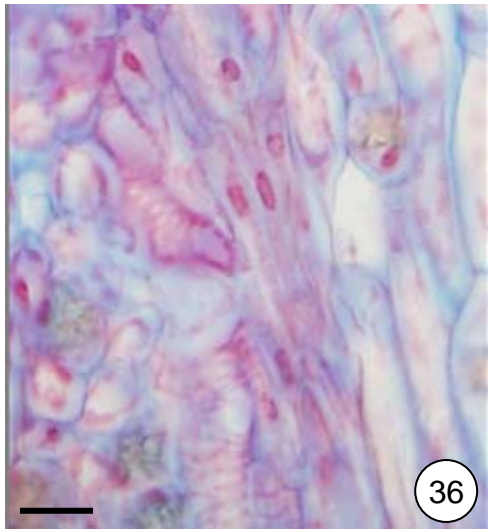
33



34

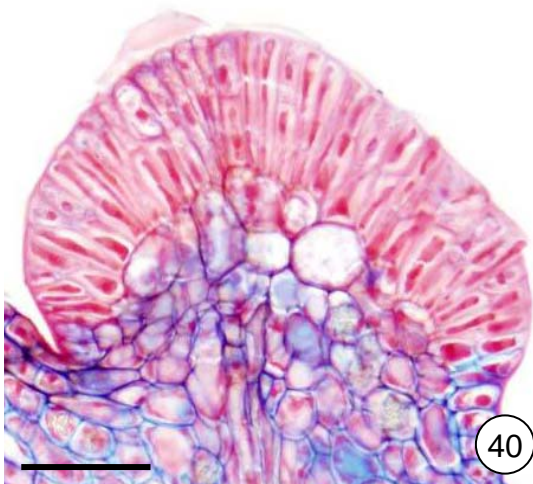
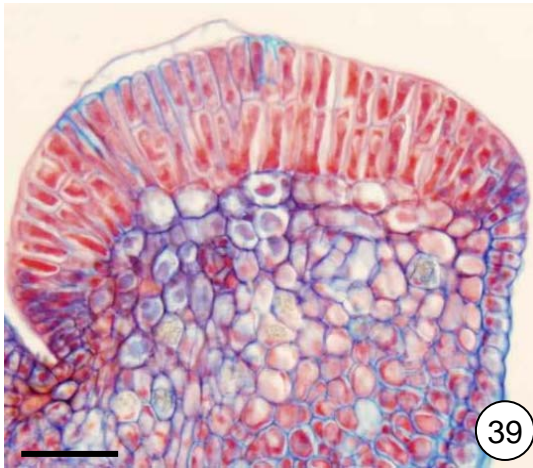
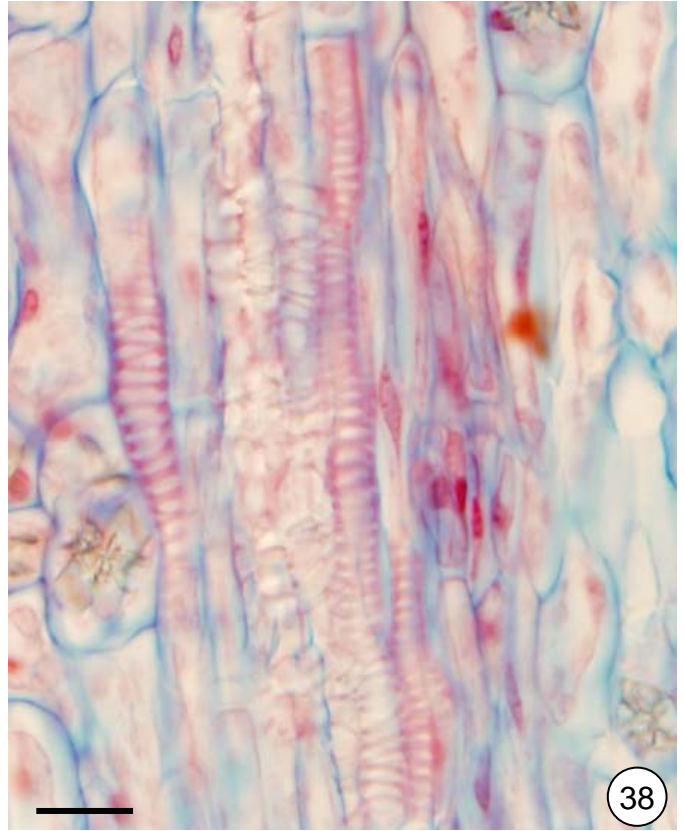
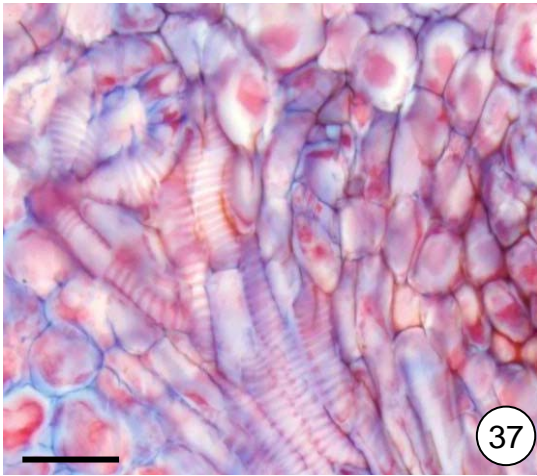


35

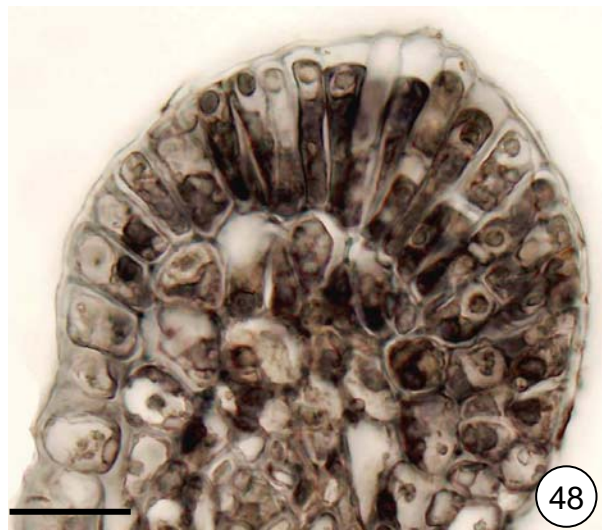
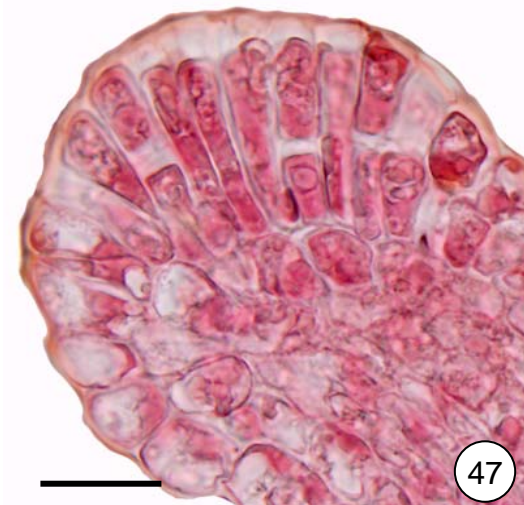
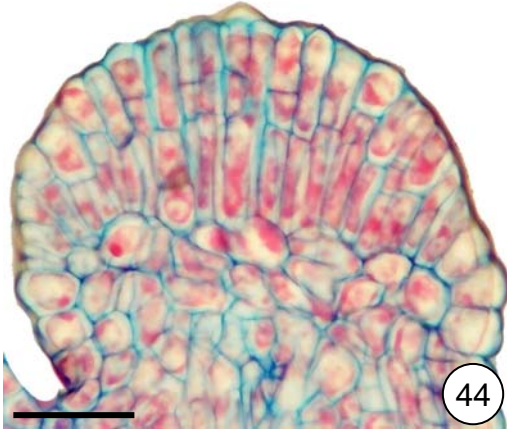
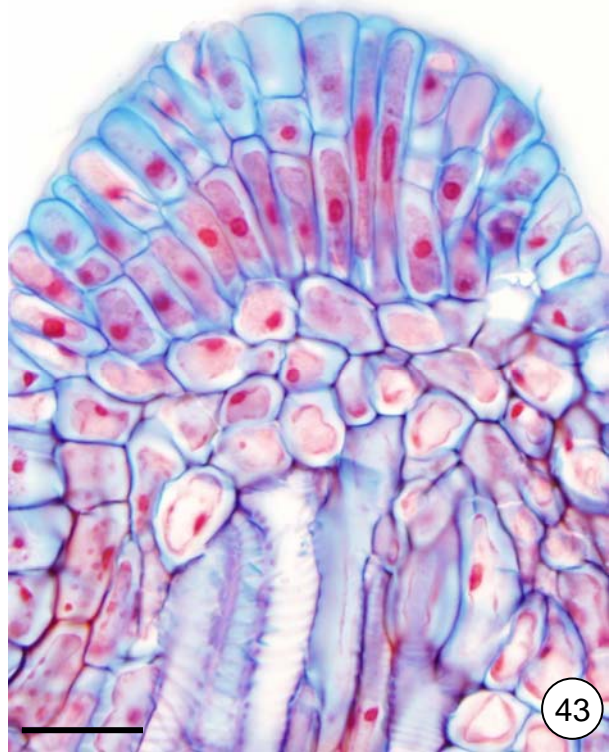
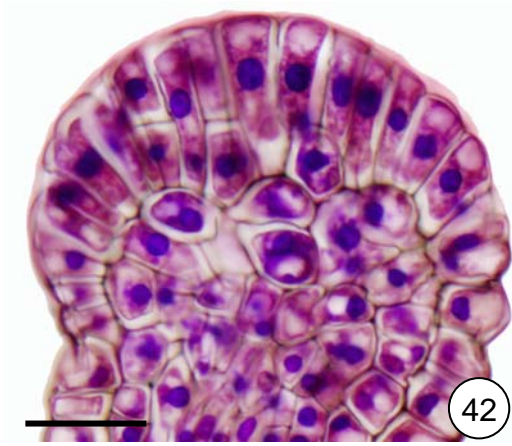


36

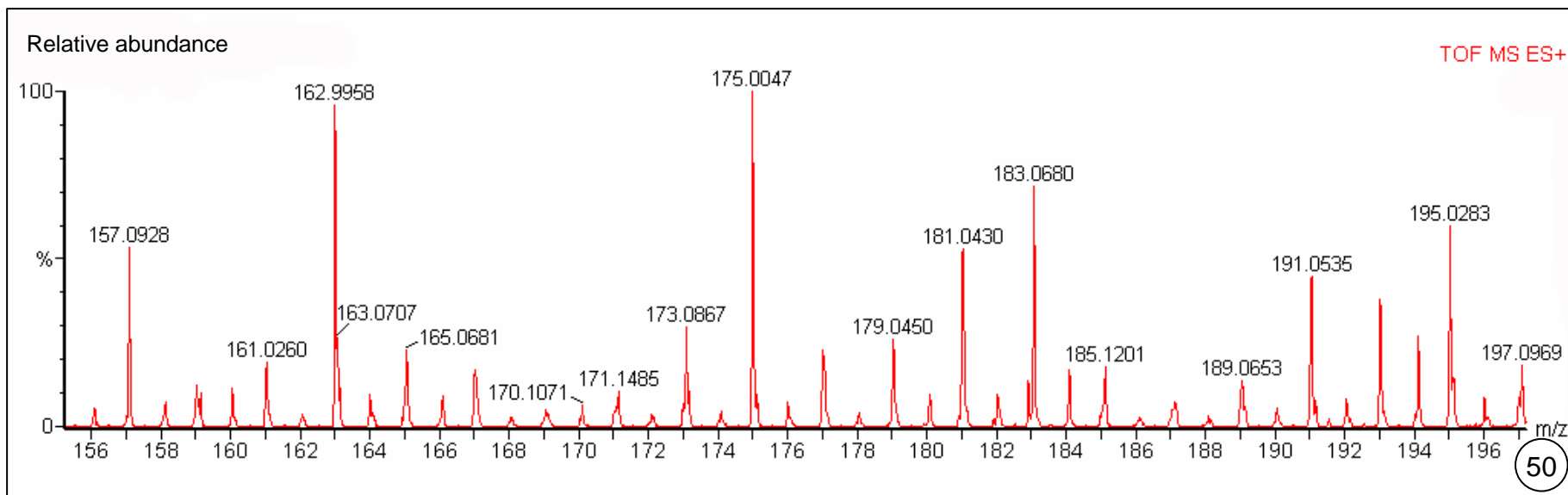
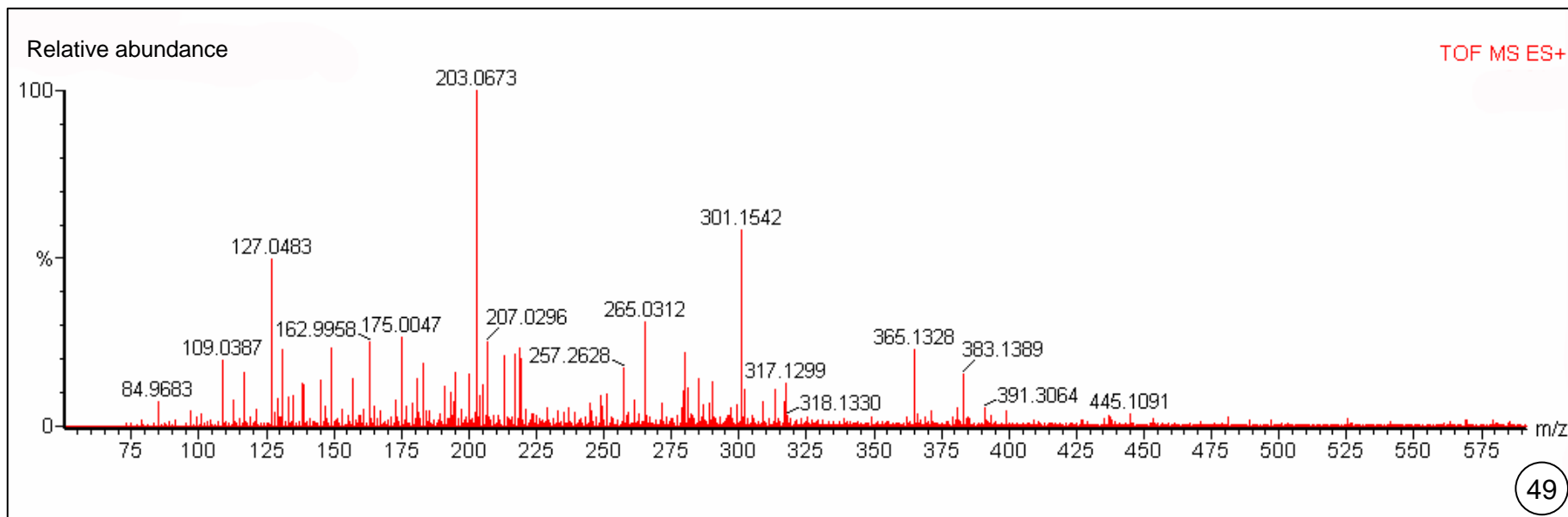
Figuras 37-41. Ontogênese, estrutura e histoquímica dos NEF laminares de *Passiflora alata* Curtis. Secções longitudinais. 37-40. Estrutura. 41. Histoquímica. 37,38. Fase pré-secretora: elementos traqueais com espessamentos de parede helicoidal a escalariforme. 39-41. Fase secretora: cutícula distendida (39) e secreção profusa (40,41). 41. Reação PAS. Barras: 50µm (39-41), 30µm (37,38).



Figuras 42-48. Ontogênese, estrutura e histoquímica dos coléteres estipulares de *Passiflora alata* Curtis. Secções longitudinais. 42-45. Estrutura. 46-48. Histoquímica. 42. Fase meristemática; notar divisões peri e anticlinais na epiderme. 43. Fase pré-secretora; conteúdo das células secretoras preservado pelo FAA. 44-48. Fase secretora: notar cutícula íntegra distendida evidenciada pelo preto de Sudão B (44) e secreção profusa (45,46). 46. Reação PAS. 47. Vermelho de rutênio. 48. Ácido tânico/cloreto férrico. Barras: 50µm (42-48).



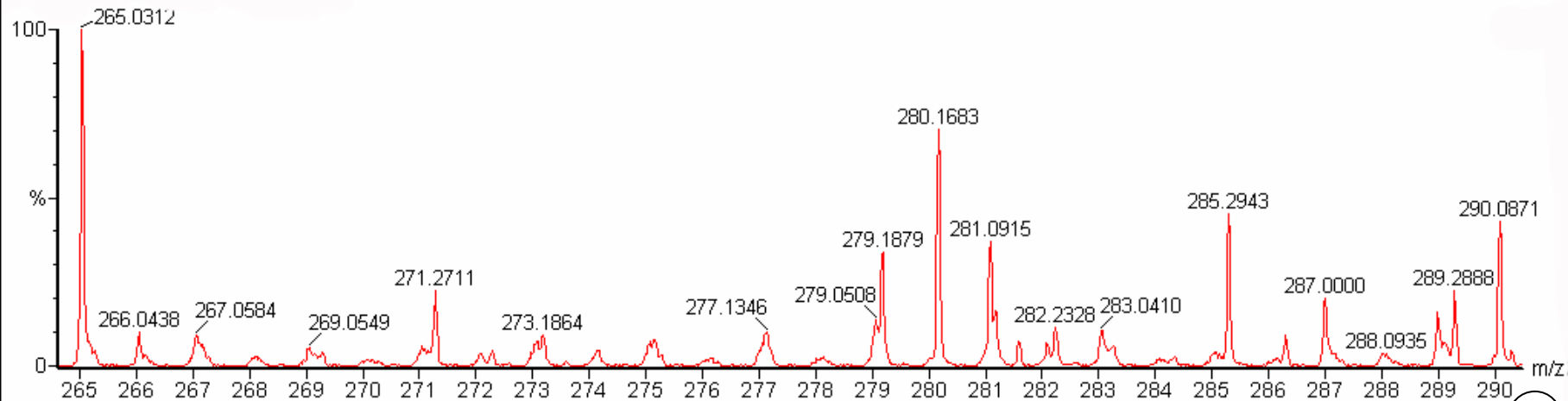
Figuras 49-50. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF laminares marginais de *P. edulis* Sims em modo positivo. Perfil dos íons correspondentes a glicose e/ou frutose (m/z 203), sacarose (m/z 365) (49) e harmana (m/z 183) (50). 49. *Full scan*. 50. Detalhe dos íons situados entre m/z 156-196.



Figuras 51-52. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF laminares marginais de *P. edulis* Sims em modo positivo. Perfil dos íons correspondentes a apigenina (m/z 271) (51) e orientina ou isoorientina (m/z 471) (52); detalhe dos íons situados entre m/z 265-290 (51) e m/z 426-478 (52).

Relative abundance

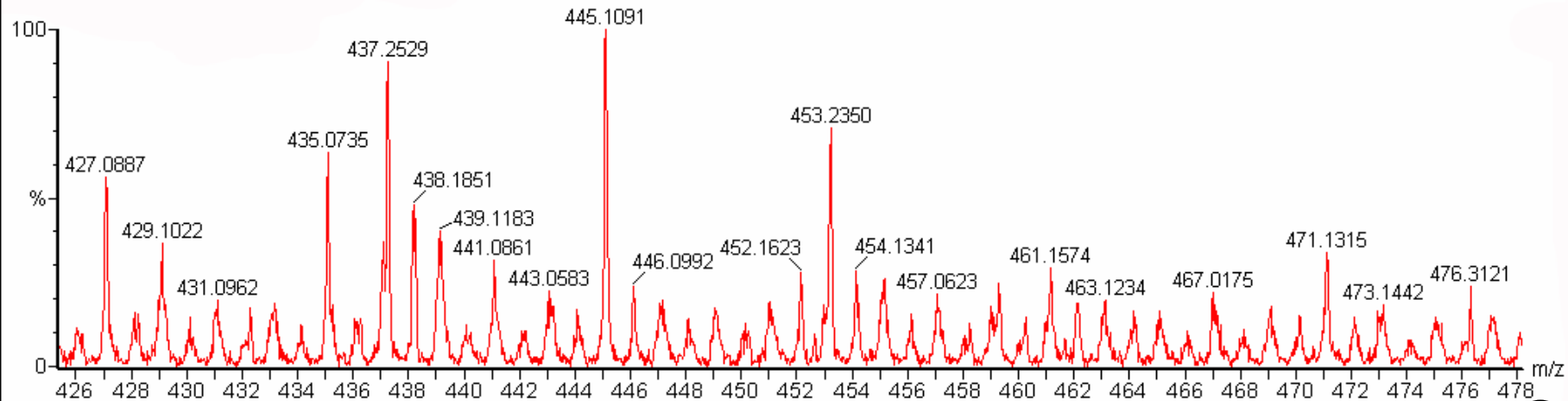
TOF MS ES+



51

Relative abundance

TOF MS ES+



52

Figuras 53-54. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF laminares marginais de *P. alata* Curtis em modo positivo. Perfil dos íons correspondentes a glicose e/ou frutose (m/z 203 e 219), sacarose (m/z 343) (53) e harmana (m/z 183) (54). 53. *Full scan*. 54. Detalhe dos íons situados entre m/z 150-200.

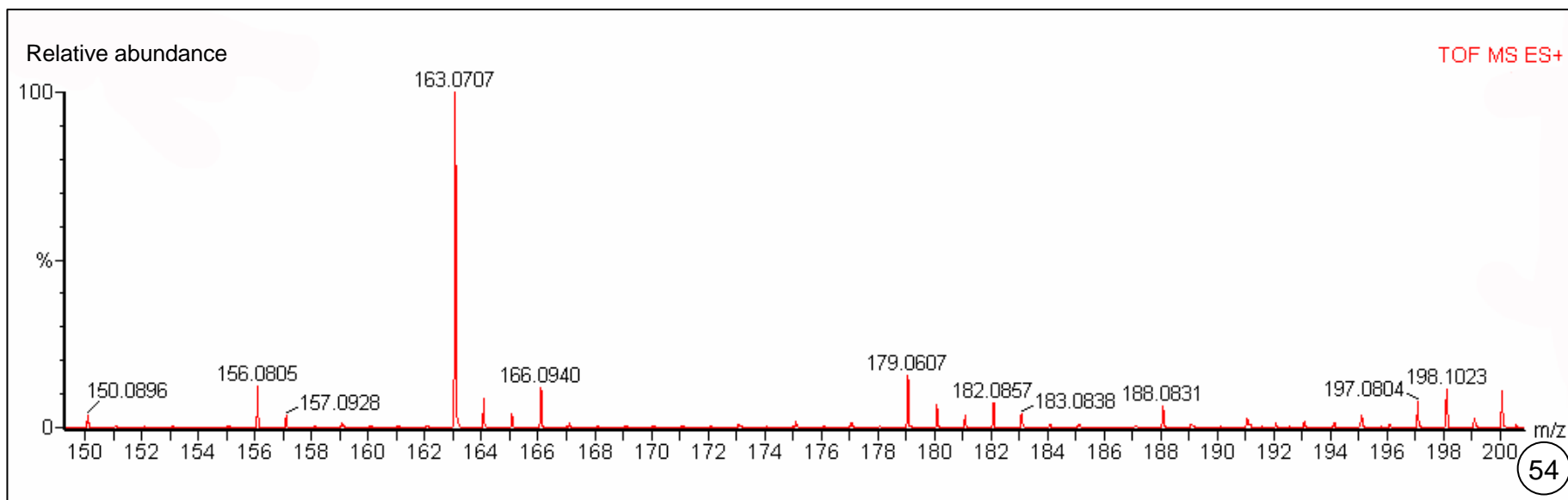
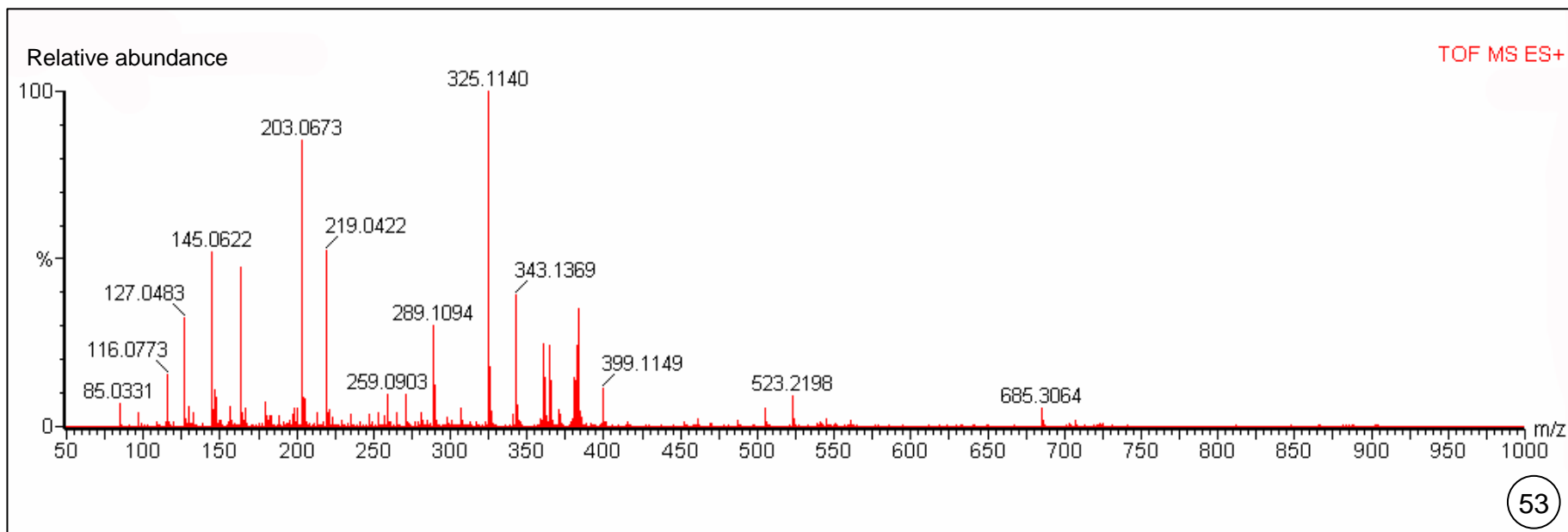


Figura 55. Espectro MS do néctar proveniente dos NEF laminares marginais de *P. alata* Curtis em modo positivo. Perfil do íon correspondente à apigenina (m/z 271); detalhe dos íons situados entre m/z 230-300.

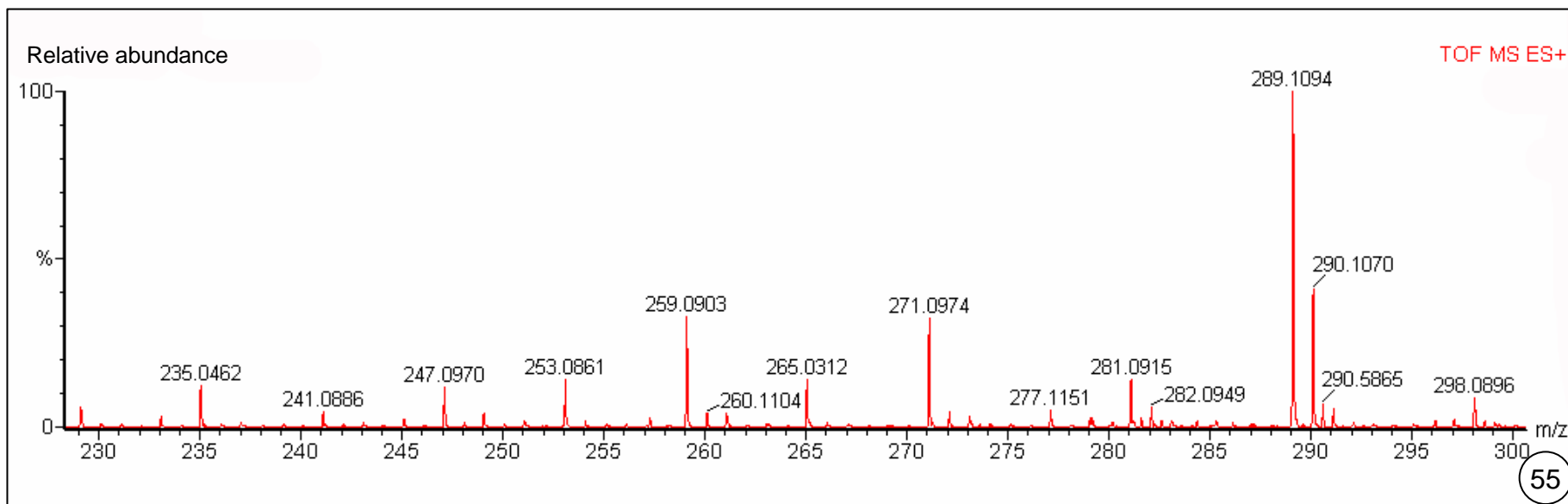
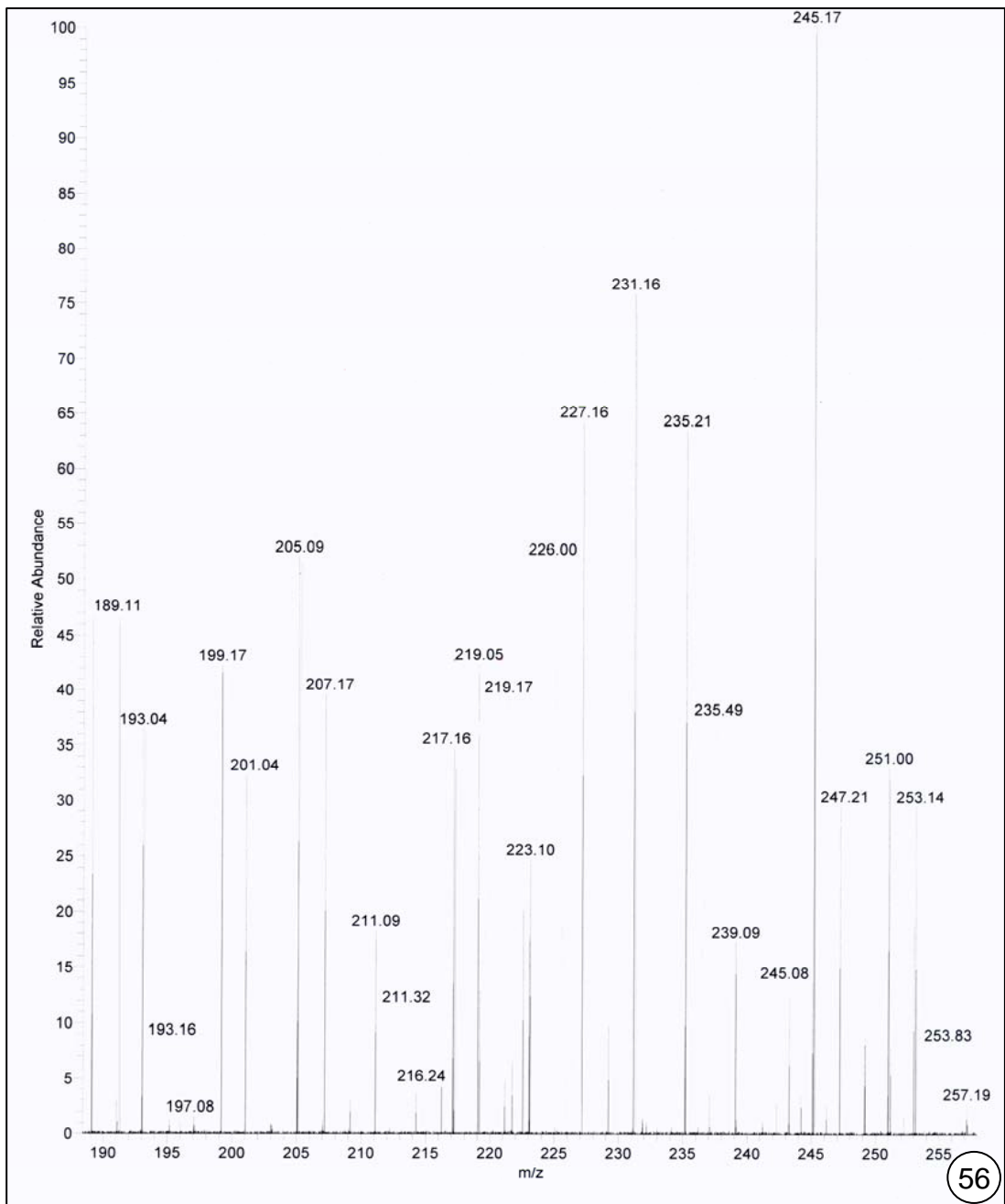


Figura 56. Espectro MS do exsudato proveniente das glândulas estipulares marginais de *P. alata* Curtis em modo positivo. Perfil dos íons correspondentes à ramnose ou xilose (m/z 189 e 205), ácido galacturônico (m/z 217) e galactose ou glicose (m/z 219); *full scan*.



Discussão

NEF laminares

Em *P. edulis*, o resultado positivo com a glicofita, a presença de formigas do gênero *Camponotus* coletando o exsudato e fungos na região não secretora na fase secretora das glândulas interlobais são evidências consistentes da natureza nectarífera destas glândulas (Keeler 1977, 1980; Keeler & Kaul 1979; Smith *et al.* 1990; Vogel 1998; Apple & Feener 2001, Dias 2008, Kobayashi *et al.* 2008). Formigas do gênero *Camponotus* coletam o néctar proveniente dos NEF foliares e bracteais de *P. coccinea*, e são capazes de remover larvas de borboletas, evidenciando a natureza agressiva e territorialista destes insetos (McLain 1983, Leal *et al.* 2006).

As glândulas laminares em *P. alata* apresentam resultado positivo com a glicofita, no entanto, as formigas não foram observadas coletando o exsudato. A presença dos NEF peciolares, mais conspícuos e que disponibilizam um maior volume de néctar aos coletores pode estar relacionada à ausência de formigas nos NEF laminares; mesmo em *P. edulis*, as formigas foram menos observadas nos NEF laminares quando comparado aos peciolares. A baixa incidência de formigas sobre os NEF laminares de *P. edulis* e a ausência em *P. alata* contrastam com os registros de coletores sobre os NEF peciolares de ambas as espécies, sugerindo que as glândulas peciolares são mais eficientes no recrutamento de formigas. Em experimentos realizados com *P. auriculata*, os NEF peciolares foram removidos e a visitação pelas formigas diminuiu, em detrimento dos NEF presentes na superfície das folhas, ainda funcionais. Este experimento evidenciou a existência de uma predileção das formigas pelos NEF que apresentam néctar em maior volume (Apple & Feener 2001). Em outro experimento desenvolvido por McLain (1983), os NEF peciolares e laminares de *P. incarnata* foram removidos e gotas de açúcar foram

aplicadas no local; como resultado, a taxa de visitação por formigas caiu. A autora sugere que as formigas são atraídas pela produção contínua de néctar, típica de NEF. Neste contexto, a maior observação de formigas nos NEF peciolares de ambas as espécies pode ser explicada por uma predileção destes invertebrados pelo maior volume e exposição do exsudato em um maior número de nós oferecido por estas glândulas.

A ocorrência de açúcar no exsudato foi evidenciada em campo pelo teste com a glicofita e confirmada por meio das análises em MS, que detectaram glicose e/ou frutose e sacarose em *P. edulis* e *P. alata*. Ainda, as análises químicas identificaram alcalóides e flavonóides no néctar de ambas as espécies. A presença de fungos majoritariamente nas regiões não-secretoras dos NEF laminares interlobais de *P. edulis* indica que os compostos bioativos presentes no néctar podem inibir a proliferação destes microorganismos. Os flavonóides e alcalóides conferem efeitos microbicidas e ação antioxidante, atuando na conservação do néctar (Stephenson 1982, Smith *et al.* 1990, Verpoorte & Schripsema 1994, Gould & Lister 2006, Nicolson *et al.* 2007).

A epiderme nectarífera dos NEF laminares de *P. alata* possui alta afinidade com a safranina, em contraste com as outras glândulas marginais, evidenciando o caráter ácido dos compostos presentes no interior destas células. Conforme o exsudato é liberado, a região perde a acidez e apresenta coloração semelhante ao encontrado nas outras glândulas foliares marginais. O caráter ácido destas células denota que o pré-néctar apresenta baixo pH; a ausência de fungos nas glândulas analisadas sugere que esta acidez está relacionada à inibição de microorganismos patogênicos (Nicolson *et al.* 2007).

A assincronia no desenvolvimento dos NEF laminares e, conseqüentemente, na produção de néctar por um grande número de glândulas possibilita o oferecimento de néctar por um longo período. A existência de um *continuum* entre os NEF laminares e peciolares de *P. edulis* é evidenciada pelo desenvolvimento basípeto apresentado pelos

NEF laminares e a finalização da fase secretora quando esta é iniciada nos peciolares. Desta forma, mantém-se o oferecimento constante de néctar nos órgãos jovens, preferencialmente escolhidos pelas fêmeas de borboletas Heliconiini para oviposição (Benson *et al.* 1975, Brown 1981, Spencer 1988). Este *continuum* não é observado em *P. alata*: a morfologia, desenvolvimento, anatomia da região secretora e compostos químicos presentes no néctar proveniente dos NEF laminares e peciolares desta espécie são distintos.

A detecção de compostos bioativos no néctar e a ausência nos tecidos nectaríferos dos NEF laminares é um indício de que estes compostos foram transportados para o néctar como consequência pleiotrópica da sua presença no floema, sem a retenção dos metabólitos no pré-néctar (Adler 2001).

Coléteres estipulares

A atividade das glândulas estipulares de *P. alata* restrita ao ápice caulinar vegetativo, a ausência de coletores e os resultados dos testes histoquímicos que evidenciam mucilagem no interior das células secretoras caracterizam estas estruturas como coléteres (Fahn 1979, Thomas 1991).

A ontogênese e atividade secretora dos coléteres nas estípulas ocorrem assincronicamente, permitindo que o exsudato esteja disponível para a lubrificação das gemas por um longo período. O desenvolvimento das glândulas é acrópeto e, provavelmente, as glândulas superiores das estípulas lubrificam o nó superior, aumentando a quantidade de secreção nesta região.

A análise do exsudato em MS confirma os resultados obtidos na histoquímica ao detectar açúcares comuns ao sistema hidro-gel que caracteriza a mucilagem – ramnose,

glicose ou galactose, xilose e ácido galacturônico (Gregory & Baas 1989, Cividanes *et al.* 1993).

A ocorrência de coléteres estipulares vascularizados é inédita em *Passiflora*. Coléteres anatomicamente semelhantes aos descritos em *P. alata* são relatados como emergências nos dentes das lâminas foliares ou perfis em espécies de *Turnera* e *Piriqueta* – Passifloraceae s.l. – (González 1993, 1998). Os coléteres de espécies de *Piriqueta* foram definidos como estípulas ou perfis reduzidos a proeminências glandulares por Arbo (1995).

Glândulas foliares marginais

Em Passifloraceae, as glândulas presentes em órgãos vegetativos são caracteres morfológicos utilizados em estudos taxonômicos e filogenéticos (Bernacci *et al.* 2003, Müschner *et al.* 2003, Yockteng & Nadot 2004). As descrições taxonômicas referem aos lobos da lâmina foliar de *P. edulis* como “lobos oval-elíptico, serreados e glandulares”; em *P. alata*, referem à presença de estípulas falciformes e margem foliar inteira a raramente denteada (Killip 1938, Bernacci *et al.* 2003). Este estudo identifica ineditamente as glândulas e ornamentações presentes nas margens da lâmina foliar de ambas as espécies como NEF e as margens denteadas das estípulas como coléteres.

As glândulas foliares estavam sempre presentes nos indivíduos analisados, entretanto, são conspícuas apenas no ápice caulinar vegetativo; após o término da fase secretora e a expansão foliar, apresentam-se como ornamentações nas lâminas de *P. edulis* e são invisíveis nas lâminas foliares e estípulas de *P. alata*.

O exsudato acumula-se entre a cutícula e a parede periclinal externa das glândulas foliares de ambas as espécies; este acúmulo também é descrito em outras espécies de *Passiflora* (Roth 1968, 1974; Durkee 1982, 1983a; Durkee *et al.* 1984; García *et al.* 2000;

Jáuregui *et al.* 2002). A ruptura da cutícula não foi observada nas glândulas foliares de ambas as espécies, mesmo naquelas em que formigas foram registradas coletando o néctar. A disponibilidade do néctar na superfície das glândulas provavelmente facilita a sua coleta, dispensando o comportamento agressivo dos invertebrados.

Cristais foram encontrados nos parênquimas secretor e fundamental das glândulas foliares marginais. Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas são particularmente abundantes no parênquima secretor das glândulas de espécies de *Passiflora* (Roth 1974; Durkee 1982, 1983a,b; Durkee *et al.* 1984; Jáuregui *et al.* 2002). No entanto, estudos anatômicos são insuficientes para categorizar a morfologia e composição química dos cristais (capítulo 1).

Sugere-se que a presença de cristais esteja relacionada ao metabolismo do floema (Elias & Gelband 1976, 1977). Os mecanismos de transporte de sacarose em plantas envolve ATPases e pode explicar a importância de se imobilizar cálcio na área do nectário em que o transporte ativo de açúcar presumivelmente ocorre (Durkee 1982). Os íons de cálcio inibem as ATPases presentes na membrana plasmática, possíveis responsáveis pelos mecanismos de transporte de açúcares; a quelação dos íons sob a forma de cristais teria a função de imobilizar o cálcio (Thadeo *et al.* 2008). Este processo pode facilitar a secreção de açúcar durante a fase secretora (Pascal 1993). A mucilagem é constituída por diversos açúcares de modo que a presença de cristais nos coléteres pode apresentar função análoga à supramencionada.

Traqueídeos e elementos de vaso com espessamentos de parede helicoidal a reticulado foram encontrados nas terminações vasculares das glândulas foliares de ambas as espécies, semelhante ao encontrado nas glândulas foliares marginais de *Passiflora cuneata* (Roth 1974).

Os NEF foliares de *P. alata*, *P. edulis* e *Turnera ulmifolia* (Elias *et al.* 1975) compartilham características que corroboram a atual circunscrição de Turneraceae em Passifloraceae *s.l.* (APG III 2009): as glândulas foliares estão ativas quando as folhas ainda são jovens; os tecidos nectaríferos são especializados e recebem seu próprio suprimento vascular; os açúcares presentes no néctar são os mesmos, compostos por glicose, frutose e sacarose (Elias *et al.* 1975). Passifloraceae *s.l.* também compartilha características das glândulas marginais com espécies de outras famílias de Malpighiales, como Euphorbiaceae, Flacourtiaceae – a maior parte dos gêneros atualmente inserida em Salicaceae (APG III 2009, Judd *et al.* 2009) –, Salicaceae e Violaceae: o exsudato é acumulado entre a cutícula e a parede periclinal externa da epiderme em paliçada; as glândulas apresentam um parênquima secretor sob o qual os feixes vasculares são encontrados; os cristais estão dispersos nos parênquimas secretor e fundamental (Metcalf & Chalk 1950; Roth 1974; Dave & Patel 1975; Belin-Depoux 1982, 1989; Durkee 1982; Durkee *et al.* 1984; Pascal 1993; Jáuregui *et al.* 2002, Wilkinson 2007).

As glândulas laminares em *Passiflora* são derivadas das margens foliares ornamentadas (denteadas) (Cusset 1965, Roth 1974). Trabalhos que enfatizam a relação entre hidatódios e NEF sugerem uma possível transição entre estas estruturas (Elias & Gelband 1977; Belin-Depoux 1982, 1989); aplicando esta hipótese em *Passiflora*, nota-se uma provável transição entre as estruturas presentes nas margens foliares de espécies desta família, que variam desde ornamentações na margem e a presença de hidatódios até o surgimento de glândulas cujo exsudato é uma estratégia da planta para modular sua interação com o ambiente, como os NEF, glândulas resiníferas e coléteres (Durkee 1983a, b; McLain 1983; Durkee *et al.* 1984; Thomas 1991; Apple & Feener 2001; Jáuregui *et al.* 2002).

Os coléteres de *P. alata* assemelham-se aos NEF laminares de ambas as espécies quanto à anatomia das glândulas. A síntese de compostos químicos diferenciados em estruturas que apresentam o mesmo padrão anatômico evidencia processos de diferenciação celular distintos, refletindo em diferentes estratégias funcionais de acordo com a posição em que as glândulas ocupam no corpo da planta.

As margens denteadas são regiões da lâmina foliar em que a taxa fotossintética é maior (Cividanes *et al.* 1993) e onde a evaporação e transpiração são particularmente intensas, devido aos fenômenos físicos envolvidos: qualquer porção curva de um objeto produz ao seu redor ondas de potencial de troca de energia elétrica, térmica ou hídrica (Wilson *et al.* 1991). Observações em campo e experimentos com uso de traçadores apoplásticos demonstram a ocorrência de um rápido fluxo de transpiração dos feixes vasculares de maior calibre para os dentes foliares em *Populus balsamifera* (Salicaceae), evidenciando que as margens denteadas são ativas na transpiração (Wilson *et al.* 1991). O surgimento de margens denteadas ocorreu para promover a liberação do excedente hídrico; esta hipótese é sustentada principalmente com base na presença destas estruturas em plantas de ambientes tropicais (Parkhurst & Loucks 1972). Pascal (1993), comparando a produção e composição dos açúcares no néctar proveniente dos NEF foliares de *Passiflora glandulosa*, relatou que a função primordial do exsudato é a liberação de açúcares, mais concentrados no néctar do que na solução do floema. O autor observou que a produção de néctar é diferente durante as estações de seca e chuva, sugerindo que a secreção é modulada pelo fluxo de água no interior das plantas, em que a secreção pelo nectário é um equilíbrio entre o suprimento de água e a atividade fotossintetizante da planta. De acordo com Parkhurst & Loucks (1972), as margens foliares denteadas evoluíram no desenvolvimento de diferentes funções ao liberar compostos repelentes, como as resinas em *P. balsamifera*. A presença de elementos traqueais

conspícuos nas glândulas foliares marginais de *P. alata* e *P. edulis* é uma evidência do abundante suprimento hídrico que estas estruturas recebem. Neste contexto, a liberação de néctar para a atração de insetos mutualistas em ambas as espécies e de mucilagem para a lubrificação das gemas em desenvolvimento em *P. alata* são evidências da diversificação dos dentes foliares e do papel destas estruturas no equilíbrio hídrico e fotossintetizante destas espécies.

Estudos moleculares realizados em espécies de *Passiflora* evidenciam que os genes envolvidos na produção da folha e suas glândulas são os mesmos envolvidos na produção de estípulas (Ulmer & MacDougal 2004) – visto que ambos são órgãos foliares. A tabela 1 apresentada na introdução relata as glândulas foliares já identificadas em *Passiflora*. A partir dos estudos ontogenéticos disponíveis em literatura (Roth 1974; Durkee 1983a,b) e da ontogênese das glândulas foliares em *P. edulis* e *P. alata*, conclui-se que as glândulas foliares em *Passiflora* são estruturas homólogas. Considerando-se esta homologia, a variação no número de glândulas foliares e estipulares em um mesmo indivíduo pode ser explicada evolutivamente como um caso de homologia em série.

A presença de glândulas foliares não é ubíqua em Passifloraceae (Killip 1938, Bernacci *et al.* 2003, Müschner *et al.* 2003, Yockteng & Nadot 2004), tampouco nas famílias inseridas em Malpighiales (Judd *et al.* 2009). Neste contexto, é provável que as espécies que apresentam estas estruturas estejam sujeitas ao mesmo tipo de pressão de seleção; a tendência de um mesmo padrão anatômico sugere uma convergência evolutiva³ deste caráter.

³ Convergência evolutiva ou evolução convergente é um fenômeno evolutivo observado nos indivíduos quando estes desenvolvem características análogas. Este fenômeno está associado à seleção natural, em que alterações morfológicas promovidas por mutações propícias a determinado ambiente são selecionadas em detrimento de outras menos adequadas. Desta forma, indivíduos sob a mesma pressão de seleção podem desenvolver estruturas similares que os permitem sobreviver a condições desfavoráveis (Ridley 2003).

Referências Bibliográficas⁴

- ADLER, L.S. 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91:409-420.
- APG III 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- APPLE, J.L. & FEENER, D.H. 2001. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. *Oecologia* 127:409-416.
- ARBO, M.M. 1995. Turneraceae. Part I. *Piriqueta*. *Flora Neotropica* 67:1-156.
- ASCENSÃO, L., MOTA, L. & CASTRO, M. de M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84:437-447.
- BELIN-DEPOUX, M. 1982. Aspects histologiques des glandes foliaires de *Idesia polycarpa* Maxim. (Flacourtiaceae). *Révision Générale Botanique* 89:111-120.
- BELIN-DEPOUX, M. 1989. Des hydathodes aux nectaires foliaires chez les plantes tropicales. *Bulletin de la Société Botanique de France* 136:151-168.
- BENSON, W.W., BROWN, K.S. & GILBERT, L.E. 1975. Coevolution of plants and herbivorous: passion flowers butterflies. *Evolution* 29:659-680.
- BERNACCI, L.C., VITTA, F.A. & BAKKER, Y.V. 2003. Passifloraceae. *In* *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo* (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd & A.M. Giulietti, orgs.). RiMa/FAPESP, São Paulo, v.3, p.252-256.
- BROWN, K.S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 36:427-456.

⁴ Apresentadas de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica.

- CASTRO, M. de M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3:1273-1284.
- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. 1976. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129:167-174.
- CIVIDANES, F.J., NAKANO, O. & MELO, M. 1993. Avaliação da qualidade de frutos de café atacados por *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Díptera: Tephritidae). *Scientia Agricola* 50:220-225.
- CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1974. Morphology, seasonal variation and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 61:835-845.
- CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1978. Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* 65:1003-1010.
- CUSSET, G. 1965. Les nectaires extra-floraux et la valeur de la feuille des Passifloracées. *Revue Générale de Botanique* 72:145–219.
- DAVE, Y.S. & PATEL, N.D. 1975. A developmental study of extrafloral nectaries in slipper spurge (*Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 62:808-812.
- DIAS, A.C.A. 2008. Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala* L. (Polygalaceae) com ênfase nas estruturas secretoras. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DURKEE, L.T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. *American Journal of Botany* 69:1420-1428.
- DURKEE, L.T. 1983a. Protein-containing cells in the nectary phloem of *Passiflora warmingii*. *American Journal of Botany* 70:1011-1018.

- DURKEE, L.T. 1983b. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. *In* The biology of nectaries (B. Bentley & T. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.1-29.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71:596-602.
- ELIAS, T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. *In* The biology of nectaries (B. Bentley & T. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.174-182.
- ELIAS, T.S. & GELBAND, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63:1349–1353.
- ELIAS, T.S. & GELBAND, H. 1977. Morphology, anatomy and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette* 138:206-212.
- ELIAS, T.S., ROZICH, W.R. & NEWCOMBE, L. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *American Journal of Botany* 62:570-576.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159.
- GARCÍA, M., JÁUREGUI, D. & PÉREZ, D. 2000. Características del indumento em hojas de cuatro especies del género *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Acta Botanica Venezuelica* 23:1-8.
- GERLACH, G. 1969. Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GONZÁLEZ, A.M. 1993. Anatomía y vascularización floral de *Piriqueta racemosa*, *Turnera hassleriana* y *Turnera joelli* (Turneraceae). *Bonplandia* 7:143-184.

- GONZÁLES, A.M. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 128:215-228.
- GOULD, K.S. & LISTER, C. 2006. Flavonoid function in plants. *In* *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, p.397-441.
- GREGORY, M. & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- HIGH, O.B. 1984. *Lipid histochemistry*. Oxford University Press, New York.
- JÁUREGUI, D., GARCÍA, M. & PEREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. *Caldasia* 24:33-40.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Books, New York.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.J., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Artmed, Porto Alegre.
- KEELER, K.H. 1977. The extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 64:1182-1188.
- KEELER, K.H. 1980. The extrafloral nectaries of *Ipomoea leptophylla* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 67:216-222.
- KEELER, K.H. & KAUL, R.B. 1979. Morphology and distribution of petiolar nectaries in *Ipomoea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 66:946-952.
- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. *Publications of the Field Museum of Natural History* 19:1-613.

- KOBAYASHI, S., ASAI, T., FUJIMOTO, Y. & KOHSHIMA, S. 2008. Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and leaf development. *Annals of Botany* 101:1035-1047.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. *In* *Insect-plant interactions* (E. Bernays, ed.). CRC Press, Boca Raton, p.81-129.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica.
- LEAL, I.R., FISCHER, K., CHRISTIAN, M., TABARELLI, K. & WIRTH, R. 2006. Ant protection against herbivores and nectar thieves in *Passiflora coccinea* flowers. *Ecoscience* 13:431-438.
- LILLIE, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. McGraw Hill, New York.
- McLAIN, K.D. 1983. Ants, extrafloral nectaries and herbivory on the passion vine, *Passiflora incarnata*. *The American Midland Naturalist* 110:433-439.
- McMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57:389-401.
- MÜSCHNER, V.C., LORENZ, A., CERVI, A.C., BONATTO, S.L., SOUZA-CHIES, T.T., SALZANO, F.M. & LORETA, B.F. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 90:1229-1238.
- NICOLSON, S.W., NEPI, M. & PACINI, E. 2007. *Nectaries and nectar*. Springer-Verlag, The Netherlands.

- O'DOWD, D.J. 1979. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia* 43:233-248.
- OLIVEIRA, P.S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Cariocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11:323-330.
- PARKHURST, D.F. & LOUCKS, L.O. 1972. Optimal leaf size in relation to environment. *Journal of Ecology* 60:505-537.
- PASCAL, L. 1993. Production et composition des nectars extra-floraux de *Stigmaphyllon convolvuliform* et de *Passiflora glandulosa*. Comparaison avec la teneur en métabolites primaires du phlème. Premiers résultats. *Acta Botanica Gallica* 140:117-131.
- PEARSE, A.G.E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- PIZZOLATO, T.D. & LILLIE, R.D. 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21:56-64.
- RICO-GRAY, V. & THIEN, L.B. 1989. Effect of different ant species on the reproductive fitness of *Schomburgkia tibicinis* (Orchidaceae). *Oecologia* 81:487-489.
- RIDLEY, M. 2003. *Evolução*. Artmed, Porto Alegre.
- ROCHA, D.I., SILVA, L.C., VALENTE, V.M.M., FRANCINO, D.M.T. & MEIRA, R.M.S.A. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). *Australian Journal of Botany* 57:619-626.
- ROTH, I. 1968. Desarrollo de los nectários extra-florales em *Passiflora foetida*. *Acta Botanica Venezuelica* 6:44-49.
- ROTH, I. 1974. Morfologia, anatomia y desarrollo de la hoja pinnada y de las glandulas marginales em *Passiflora*. *Acta Botanica Venezuelica* 9:398-401.

- SMITH, L.L., LANZA, J. & SMITH, G.C. 1990. Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. *Ecology* 71:107-115.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Clarendon Press, Oxford.
- SOUZA, L.M. 2008. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SPENCER, K.C. 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. *In* Chemical mediation of coevolution (K.C. Spencer, ed.). Academic Press Inc, San Diego, p.168-175.
- STEPHENSON, A.G. 1982. Iridoid glycosides in the nectar of *Catalpa speciosa* are unpalatable to nectar thieves. *Journal of Chemical Ecology* 8:1025-1034.
- SVEDSEN, A.B. & VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Co., New York.
- TATTINI, M., GRAVANO, E., PINELLI, P., MULINACCI, N. & ROMANI, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148:69-77.
- THADEO, M., CASSINO, M.F., VITARELLI, N.C., AZEVEDO, A.A., ARAÚJO, J.M., VALENTE, V.M.M. & MEIRA, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 95:1515-1522.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- ULMER, T. & MacDOUGAL, J.M. 2004. *Passiflora*: passionflowers of the world. Timber Press, Cambridge.

- VERPOORTE, R. & SCHRIPSEMA, J. 1994. Isolation, identification, and structure elucidation of alkaloids: a general review. *In* Modern methods of plant analysis (H.F. Linskens & J.F. Jackson, eds). Springer-Verlag, Amsterdam, p.1-22.
- VOGEL, S. 1998. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. IV. Miscellaneous cases. *Flora* 193:225-248.
- WÄCKERS, E.L., ZUBER, D., WUNDERLIN, R. & KELLER, F. 2001. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany* 87:365-370.
- WILKINSON, H.P. 2007. Leaf teeth in certain Salicaceae and "Flacourtiaceae". *Botanical Journal of the Linnean Society* 155:241-256.
- WILSON, T.P., CANNY, M.J. & McCULLY, M.R. 1991. Leaf teeth, transpiration and the retrieval of apoplastic solutes in balsam poplar. *Physiologia Plantarum* 83:225-232.
- WOLLENWEBER, E. 1982. Flavonoids. *In* Flavonoids: advances and research (J.B. Harbone & T.J. Mabry, eds). Chapman and Hall, London, p.189-259.
- YOCKTENG, R.S. & NADOT, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthase nuclear gene expressed in the chloroplast (*ncpGS*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:379-396.
- YODER, L.R. & MAHLBERG, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63:1167-1173.

CAPÍTULO 3

Localização *in situ* de compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae)

Introdução

As plantas estão submetidas a uma variedade de pressões seletivas bióticas e abióticas, em que os herbívoros destacam-se como os maiores responsáveis pelo impacto negativo sobre a aptidão dos vegetais (Belsky 1993, Cipollini & Levey 1997). Uma das respostas evolutivas das plantas é o desenvolvimento de uma ampla gama de compostos químicos, referidos como metabólitos secundários (Franceschi *et al.* 1998), assim denominados por não pertencerem ao metabolismo primário. Estes compostos influenciam fortemente o padrão de uso dos recursos vegetais por insetos fitófagos (Fraenckel 1959).

O interesse na identificação e entendimento dos mecanismos químicos de defesa reside, em parte, nas espécies que apresentam potencialidades farmacológicas e, conseqüentemente, econômicas (Franceschi *et al.* 1998). Dentre a gama de metabólitos secundários cuja finalidade farmacológica é bem estabelecida, destacam-se os alcalóides e flavonóides. Os alcalóides possuem uma ampla variedade de estruturas químicas e atividades biológicas, usados na medicina tradicional e moderna no tratamento de diversos distúrbios (Otani *et al.* 2005). Estes compostos promovem uma barreira biológica protetora contra patógenos ou herbívoros nas plantas, devido à alta atividade antifúngica, antimicrobiana e anti-herbivoria (Kutchan 2005, Otani *et al.* 2005). Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos que possuem papel importante na interação das plantas

com o ambiente (Harbone 1973), atuando como defensivos das plantas contra agentes bióticos – bactéria, fungos, herbívoros – e abióticos – poluição, metais pesados, radiação UV-B (Dixon & Paiva 1995, Iwashina 2000, Optiz 2002).

A importância dos compostos bioativos na defesa das plantas e como fonte de medicamentos para os humanos tem atraído a atenção de pesquisadores, visto que a concentração destes compostos, principalmente dos alcalóides, é extremamente baixa nas plantas e a tentativa de produção comercial por meio de técnicas de cultura de células e/ou tecidos é muitas vezes inviável (Fowler 1981, Lindsey & Yeoman 1983). Neste contexto, o estudo integrado entre as rotas biossintéticas e os tecidos vegetais envolvidos tem sido ativamente desenvolvido e modelos estabelecidos (DeLuca & St-Pierre 2000, Moll *et al.* 2002, Weid *et al.* 2004, Facchini 2005, Kutchan 2005, Marinova *et al.* 2007).

Passiflora alata Curtis e *P. edulis* Sims são espécies que apresentam reconhecido valor farmacológico e econômico, amplamente usadas no tratamento de distúrbios psíquicos (Graeff & Guimarães 1999; Petry *et al.* 2001; Dhawan *et al.* 2001a,b,c, 2004; Otobone *et al.* 2005; Akhondzadeh & Maleki 2006; Castro *et al.* 2007). Os órgãos vegetativos aéreos constituem a droga vegetal¹ nestas espécies; a totalidade dos constituintes das folhas do vegetal é empregada na produção dos fármacos em virtude do desconhecimento dos compostos químicos responsáveis pelas atividades farmacológicas (Zuanazzi & Montanha 2001, Dhawan *et al.* 2004), embora se especule que sejam **alcalóides**, **flavonóides** ou um **complexo alcalóide-flavonóide** (Lutomski *et al.* 1974, 1975; Lutomski & Malek 1975). Os maiores constituintes químicos de *P. alata* e *P. edulis* são os flavonóides, usados como marcadores taxonômicos em espécies de *Passiflora*, enquanto os alcalóides apresentam-se em baixas concentrações (Rehwald *et al.* 1994, Zuanazzi & Montanha 2001).

¹ Planta medicinal ou suas partes após processos de coleta, estabilização e secagem (Sonaglio *et al.* 2007)

A síntese dos alcalóides e flavonóides identificados em ambas as espécies é conhecida (Slaytor & McFarlane 1968, Copeland & Slaytor 1974, Herbert & Mann 1982, Kumazawa *et al.* 2000); no entanto, estudos que relacionem estes compostos aos tecidos em que ocorrem são ainda inexistentes.

Uma ampla variedade de metabólitos secundários é sintetizada em células secretoras altamente especializadas, os idioblastos (Fahn 2000, Castro & Demarco 2008). Estudos que aliam a biossíntese de compostos bioativos às organelas e células envolvidas referem à síntese e/ou armazenamento de flavonóides, alcalóides e terpenos no interior destas células (DeLuca & St-Pierre 2000, Bird *et al.* 2003, Weid *et al.* 2004, Mahroug *et al.* 2006).

Procedimentos histoquímicos são úteis na localização *in situ* das principais classes de metabólitos presentes na secreção das plantas (Castro & Demarco 2008). Os testes histoquímicos foram desenvolvidos para análises qualitativas e quantitativas de virtualmente todos os componentes celulares, incluindo carboidratos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos secundários e uma variedade de elementos iônicos que ocorrem nas soluções celulares (Gahan 1984, Gersbach *et al.* 2001, Caissard *et al.* 2004). Atualmente, estas técnicas têm sido usadas como um método qualitativo na localização *in situ* dos metabólitos detectados nas análises químicas dos extratos das plantas, como alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Ferreira *et al.* 1998, DeLuca & St-Pierre 2000, Facchini 2005, Marinova *et al.* 2007, Ziegler & Facchini 2008) e compostos fenólicos – incluindo flavonóides (Schnitzler *et al.* 1996; Valette *et al.* 1998; Soukupová *et al.* 2000; Tattini *et al.* 2000, 2004, 2005; Gould & Lister 2006; Vermerris & Nicholson 2006; Ni *et al.* 2007).

Os testes histoquímicos consistem de métodos rápidos e economicamente acessíveis que garantidamente provêm resultados qualitativos quanto à localização

espacial de metabólitos secundários, sendo uma ferramenta fundamental nos estudos iniciais de integração entre rotas biossintéticas e células, tecidos e órgãos envolvidos.

O sucesso da histoquímica depende do monitoramento dos tratamentos e da avaliação cuidadosa na localização de substâncias ou reações. Dois critérios básicos devem ser considerados na aplicação dos testes: (i) é imperativo que exista um total entendimento das reações químicas que se desenvolvem entre os reagentes e os compostos nas células; (ii) as reações devem ser desenvolvidas no material em condições mais próximas possíveis das células vivas (Gahan 1984). Existe uma correspondência direta entre a intensidade da coloração e a concentração do composto de interesse na célula, de forma que os compostos que se apresentam em traços não são detectados devido à sensibilidade das técnicas (Goodwin 1976). Desta forma, a localização dos sítios de síntese é inviável quando os compostos químicos e/ou seus precursores estão em baixa concentração.

A presente pesquisa tem o propósito de localizar *in situ* os possíveis sítios de translocação/armazenamento de compostos bioativos – alcalóides e flavonóides – nos órgãos vegetativos aéreos de *P. alata* e *P. edulis*, por meio de testes histoquímicos com reagentes específicos. No contexto das atuais investigações que acoplam técnicas anatômicas, ultra-estruturais e moleculares ao estudo da biossíntese de compostos bioativos, este trabalho possui caráter contemporâneo ao localizar alcalóides e flavonóides em espécies de expressiva relevância econômica.

Materiais e Métodos

Em campo

Indivíduos de *P. alata* e *P. edulis* foram coletados no CPQBA (Paulínia, SP), disponibilizados pelo Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães, e identificados pelo especialista Dr. Luis Bernacci do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O material testemunha de cada espécie foi providenciado e incluído no Herbário UEC. Dados referentes ao material testemunha são apresentados a seguir: *P. alata* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 25-VII-2009, *P.R. Cardoso* 3 (UEC 145620); *P. edulis* – BRASIL: SÃO PAULO: Paulínia, CPQBA, 24-XI-2008, *P.R. Cardoso* 2 (UEC 111509).

Os aspectos morfológicos foram registrados em dois indivíduos sombreados e dois expostos à luz solar de ambas as espécies. O material botânico coletado consistia de ápices caulinares vegetativos e sete nós visíveis subseqüentes de plantas sadias. Ressalta-se que ambas as espécies são cultivadas sob as mesmas condições.

Microscopia óptica e de fluorescência

Ramos vegetativos aéreos de dois indivíduos de cada espécie foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico, 1:1:18 v:v; Johansen 1940) por 24h para preservar compostos hidrofílicos; em formalina neutra tamponada (FNT; Lillie 1965) por 48h para os compostos lipofílicos; e em sulfato ferroso em formalina (SFF; Johansen 1940) por 48h para a localização *in situ* de compostos fenólicos totais (Castro & Demarco 2008). Algumas classes de compostos fenólicos, como os flavonóides, podem ser sintetizadas devido a variações ambientais (Dixon & Paiva 1995), desta forma, indivíduos expostos à luz solar e sombreados foram coletados nos meses de verão e inverno, e as análises posteriores realizadas em material processado e em secções à mão livre obtidas do segundo ao quarto internó visível.

Diafanização

Lâminas foliares de ambas as espécies e estípulas do quinto nó de *P. alata* foram fixadas em FAA e SFF, diafanizadas (Johansen 1940, Shobe & Lersten 1967) e montadas em resina sintética.

Estudos estruturais e histoquímicos²

Em ambas as espécies, ápices caulinares vegetativos, caules, gavinhas e folhas do segundo ao quinto internó/nó visíveis foram isolados. O material foi desidratado em série butílica ascendente (álcool butílico terciário, Johansen 1940) e incluído em parafina. Os cortes seriados obtidos foram corados com safranina e azul de astra (Gerlach 1969), e as lâminas montadas em resina sintética.

Secções a mão livre de material fresco foram efetuadas nos órgãos expostos ao sol para a localização *in situ* de antocianinas. Testes para a localização *in situ* de metabólitos foram aplicados em material fresco e fixado seccionados a mão livre do terceiro e quarto internó/nó visível: reagente de Wagner e de Dragendorff para evidenciar aminas terciárias e quaternárias presentes em alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976, Furr & Mahlberg 1981, Svedsen & Verpoorte 1983); cloreto de alumínio e reagente natural A para evidenciar flavonóides (Charrière-Ladreix 1976, Wollenweber 1982, Tattini *et al.* 2000). Os tratamentos estão citados na tabela 1.

Observações das secções sem tratamento sob luz branca, azul e UV foram realizadas previamente para caracterizar o branco e a autofluorescência dos compostos (Charrière-Ladreix 1976). O controle dos testes para detecção de alcalóides foi efetuado pelo tratamento prévio das peças com ácido tartárico 5% (Svedsen & Verpoorte 1983);

² A sensibilidade dos testes histoquímicos é da ordem de 1-10µg; compostos cuja concentração se apresenta em traços não são detectados (Goodwin 1976).

para a extração dos compostos fenólicos, o material foi submetido a uma mistura etanol/ácido clorídrico 1% (9:1 v:v) à temperatura ambiente (modificado de Harbone 1973).

A técnica *in vitro* para estimar a atividade antioxidante pelo uso do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH³) (Mensor *et al.* 2001, Molyneux 2004) foi adaptada para observação desta atividade *in situ*. Inicialmente, registrou-se o branco das secções sob luz azul e luz UV. Em seguida, as mesmas foram tratadas com DPPH (100µM, 80% em metanol) por 30min no escuro. As lâminas foram montadas em água.

O controle negativo foi procedido com o tratamento prévio das secções por uma solução de 2,5mL de etanol 100% e 1mL de DPPH (Kim *et al.* 2002) por 30min no escuro. O controle positivo foi realizado por meio da observação de papéis cromatográficos contendo extratos de *Citrus*, *Coffea*, *Eucalyptus* e *Passiflora*, em que a atividade antioxidante foi estimada com o uso deste reagente.

A localização de cristais em material diafanizado e incluído em parafina foi efetuada por meio da observação das lâminas sob luz polarizada.

Observações sob fluorescência nas bandas do UV e azul foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 equipado com lâmpada de mercúrio (HBO 100W) e filtros bloqueadores BA420 e BA515 (filtros de excitação BP330-385, BP450-480 e espelho dicromático DM400 e DM500, respectivamente).

Os aspectos relevantes foram registrados através de imagens (600dpi) obtidas na câmera digital DP71 acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX51 e em filme Pro Image Kodak 100, e os negativos digitalizados. As escalas foram obtidas pela projeção da

³ *In vitro*, a redução da absorbância do radical DPPH ocorre em resposta à presença de antioxidantes; a mudança de coloração se dá pela cor púrpura a branca sob comprimento de onda de 515-517nm – luz visível (Molyneux 2004). Modificações a esta técnica permitem sua aplicação em cromatografias de papel e camada delgada – superfícies brancas – e, neste caso, as observações são realizadas sob luz UV (Kim *et al.* 2002).

lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas. As imagens foram editadas no programa Photoshop 7.0 para a elaboração das pranchas.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A observação das características das células com conteúdo fenólico foi procedida nas secções transversais do quarto internó visível do caule de um indivíduo de cada espécie e dos NEF peciolares do quarto nó visível de *P. alata*. O material foi fixado em Karnovsky (Kraus & Arduin 1997), desidratado em série etílica ascendente, seco pelo método de ponto crítico e metalizado com ouro coloidal (Ascensão *et al.* 1999, modificado).

As observações e captura de imagens (600dpi) foram procedidas em microscópio JEOL JSM 5000LV 6350 a 20kV, do Instituto de Química/Unicamp, e as imagens editadas no programa Photoshop 7.0.

Resultados

Microscopia óptica e de fluorescência

Antocianinas (figuras 1-7)

Em ambas as espécies, as antocianinas são observadas nos indivíduos expostos ao sol, independente da época do ano em que são analisados. As células com antocianinas encontram-se em tecidos nos quais a incidência de luz solar é direta; este pigmento está localizado no interior do vacúolo de células subepidérmicas nas secções a fresco das alas do caule em *P. alata* (figura 1) e no caule, gavinha e lâmina foliar – nesta também no interior do vacúolo de células epidérmicas – de *P. edulis* (figuras 2-5).

As antocianinas são preservadas pelo fixador SFF e identificadas na região costal e nas margens, incluindo os NEF marginais, das folhas diafanizadas de *P. edulis* (figuras 6,7).

Folhas diafanizadas e coradas (figuras 8-12)

Idioblastos secretores são identificados nas estípulas e lâminas foliares do quinto nó visível de *P. alata*: estas células são alongadas nas regiões costais (figura 8) e curtas nas intercostais foliares (figura 9). Estes idioblastos apresentam uma distribuição basípeta, concentrando-se na base das estípulas e lâminas foliares, e raramente estão presentes próximos aos coléteres e NEF marginais (figura 10); eles não foram evidenciados nas preparações de *P. edulis* (figuras 11,12).

Compostos bioativos

Estudos estruturais (figuras 13-28)

Células com antocianinas são observadas na epiderme e camadas subepidérmicas da ala do caule (figura 13) e na gavinha (figura 16) de *P. alata*, identificadas nas secções histológicas pelo aspecto denso corado em vinho pela safranina⁴.

O ápice caulinar vegetativo de ambas as espécies é desprovido de idioblastos secretores de compostos bioativos; estas células são identificadas nas secções pelo conteúdo denso (figuras 18,25) ou granuloso de mesma coloração apresentada pelas antocianinas e pela posição que ocupam. Estes idioblastos são encontrados entre as células dos tecidos vasculares do caule, gavinha, pecíolo e lâmina foliar do segundo ao quarto internó/nó visível (figuras 14-18,20,22-25,27), ocorrendo majoritariamente entre as células do floema.

Os idioblastos secretores são mais freqüentes e conspícuos no floema secundário (figuras 14,15,24), e no xilema primário da região nodal (figura 23).

⁴ Precipitados intracelulares de aparência densa após a aplicação de corantes básicos, como a safranina, são indicativos de compostos fenólicos (Gardner 1975).

Em *P. alata*, os idioblastos secretores são identificados entre as células do parênquima nectarífero dos NEF peciolares em fase secretora (figura 19).

Os cristais estão localizados paralelos aos feixes vasculares nos diferentes órgãos de ambas as espécies (figuras 21,26,28).

Testes histoquímicos (figuras 29-51)

O material fixado em SFF evidencia o conteúdo fenólico dos idioblastos secretores dispersos nos tecidos vasculares de ambas as espécies (figuras 29,33) e as antocianinas na epiderme e camadas subepidérmicas da lâmina foliar de *P. alata* (figura 32). As secções longitudinais do pecíolo mostram idioblastos com conteúdo fenólico denso e granuloso (figuras 30 e 31).

Os testes efetuados em plantas coletadas no inverno e verão de ambas as espécies apresentam resultados semelhantes e os compostos bioativos não foram detectados nas células meristemáticas do ápice caulinar vegetativo.

Os dados dos testes para a localização *in situ* dos compostos bioativos aplicados no caule, gavinha e folha do terceiro e quarto internó/nó visível de ambas as espécies estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultado dos testes histoquímicos aplicados nos órgãos vegetativos aéreos de *P. alata* e *P. edulis*.

Metabólitos identificados	Tratamentos	Cor (resultado positivo)	Figuras
Alcalóides	Reagente de Wagner	marrom	34
	Reagente de Dragendorff	marrom avermelhado	35,36
Compostos fenólicos totais	SFF*	marrom a preto	37,38,39
	autofluorescência	amarelo esverdeado, lilás, azul, verde (em luz UV**)	40,42,44,48
		amarelo (em luz azul***)	47
Flavonóides ⁵	Natural A	amarelo, laranja, amarelo esverdeado	41,45,49
	Cloreto de alumínio	amarelo, laranja, amarelo esverdeado	43,50
Atividade antioxidante dos flavonóides	DPPH	amarelo, laranja e amarelo esverdeado	46,51

Notas: *fixador; **365nm; ***470nm.

Os testes histoquímicos localizam alcalóides e compostos fenólicos, incluindo flavonóides, no interior do vacúolo dos idioblastos dispostos majoritariamente entre as células do floema (figuras 34,37-39).

A autofluorescência dos compostos fenólicos é visualizada nos idioblastos de secções sem tratamento sob luz azul (figura 47) e UV (figuras 40,42,44,48) provenientes do caule e folhas de ambas as espécies, e nos idioblastos dispersos no parênquima nectarífero de *P. alata* (figura 44). Os testes específicos para flavonóides demonstram que o conteúdo autofluorescente dos idioblastos é resultado da presença desta classe de compostos (figuras 41,43,45,49,50).

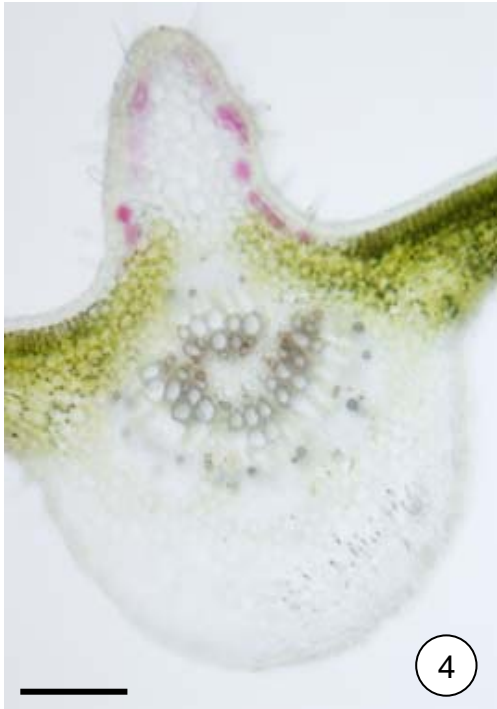
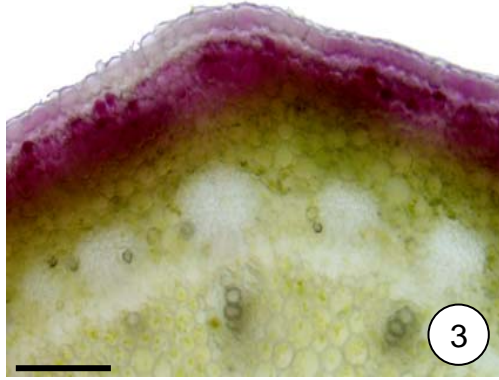
Os resultados com o reagente DPPH evidenciados nas secções do caule indicam a atividade antioxidante no vacúolo dos idioblastos secretores dispersos entre as células dos tecidos vasculares (figuras 46,51).

⁵ Sob luz UV (365nm), o cloreto de alumínio revela os 5-hidroxi-flavonoides em cor amarela, enquanto o natural A revela os 3',4'-dihidroxi-flavonas e flavonóis em cor laranja, e 4'-hidroxi equivalentes em cor amarelo esverdeado (Markham 1982).

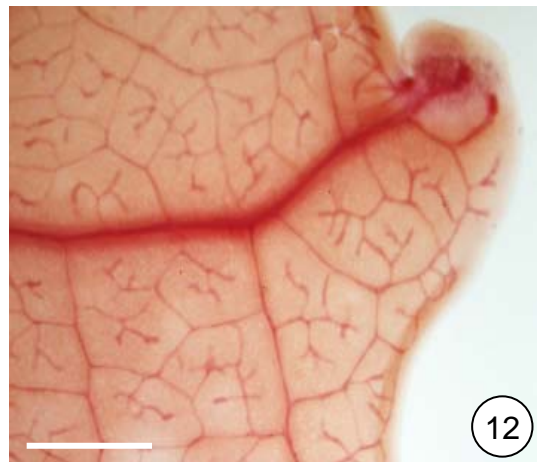
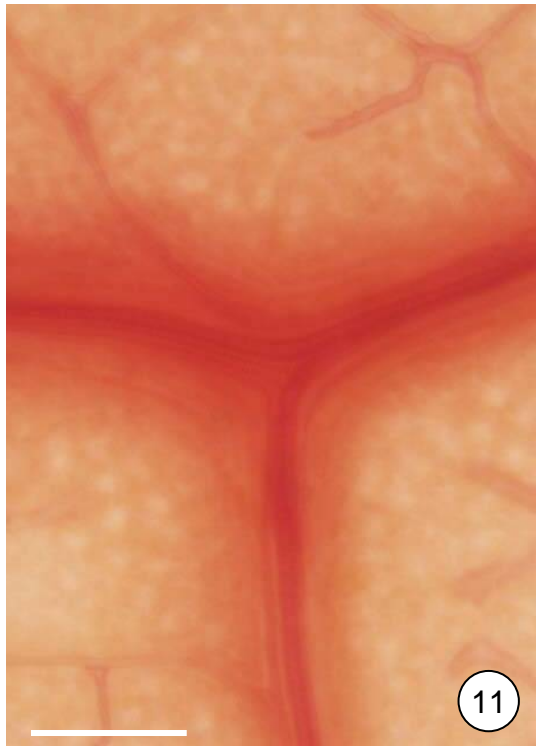
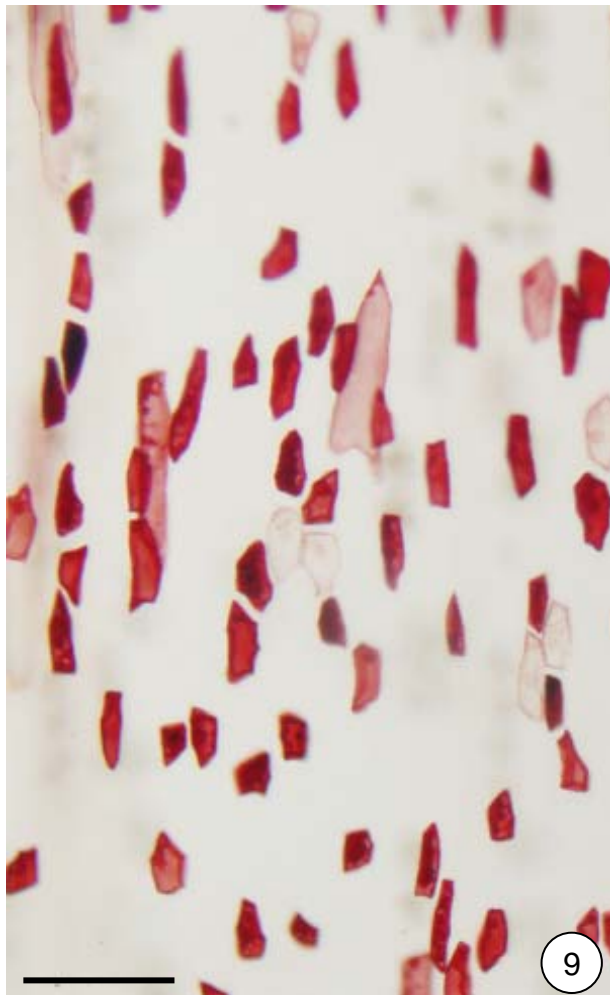
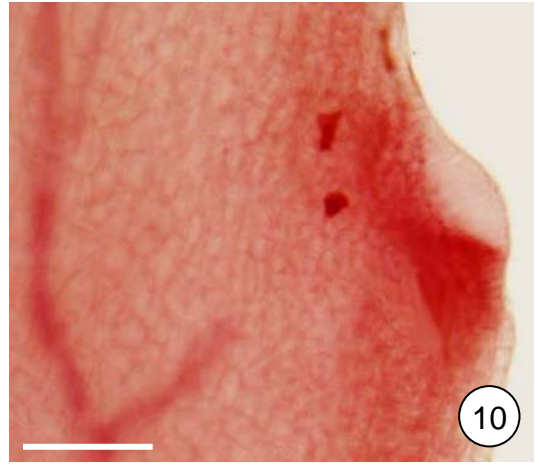
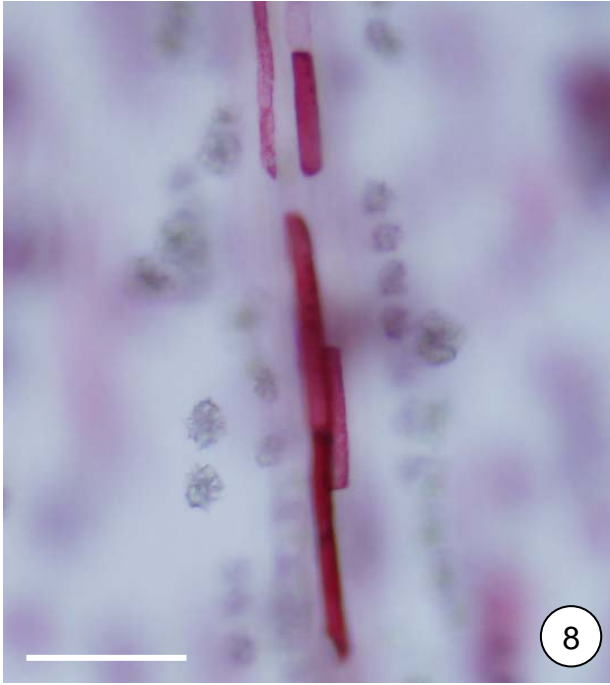
Microscopia eletrônica de varredura (figuras 52-54)

Os compostos fenólicos apresentam aspecto globular (*inset* figura 52; seta curta, figura 54) ou esponjoso (seta longa; figuras 53,54) no vacúolo dos idioblastos secretores dispersos no parênquima nectarífero do NEF peciolar de *P. alata* (figura 53) e nos tecidos vasculares do caule de ambas as espécies (figuras 52,54).

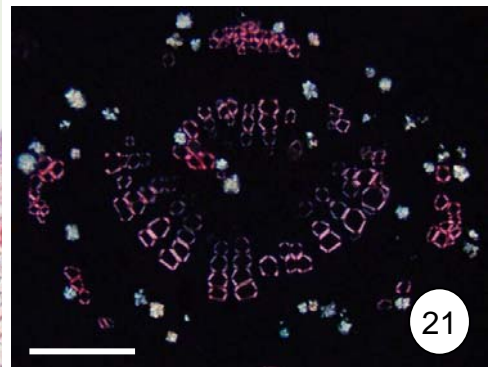
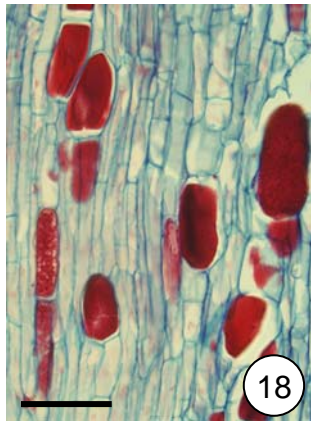
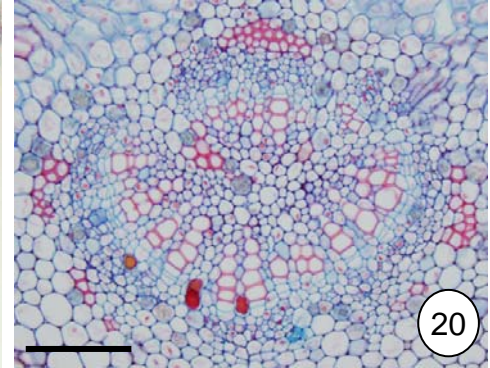
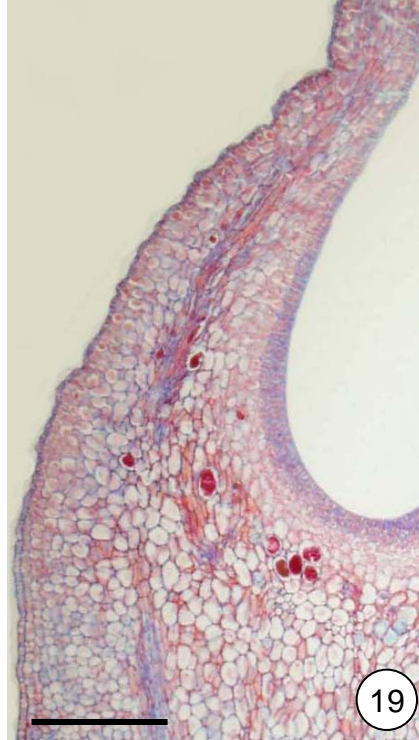
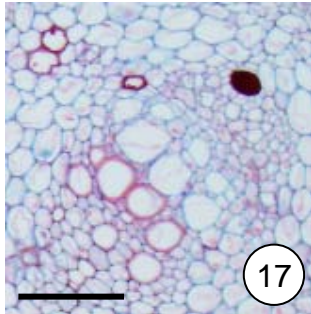
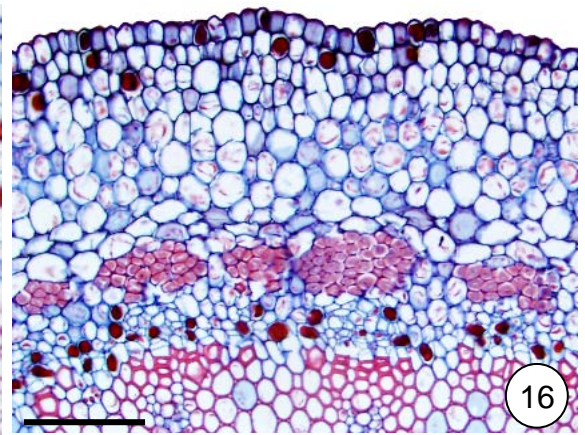
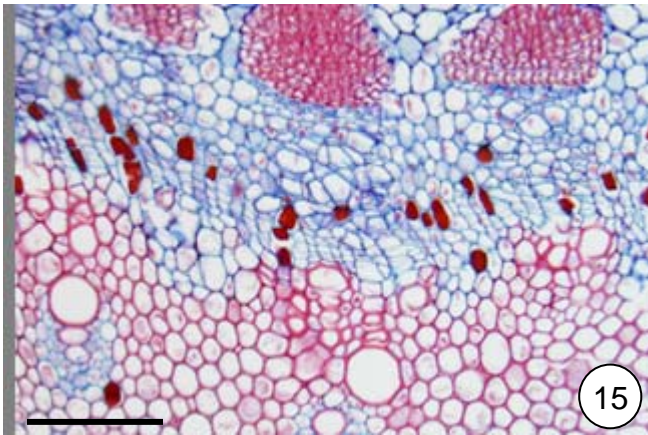
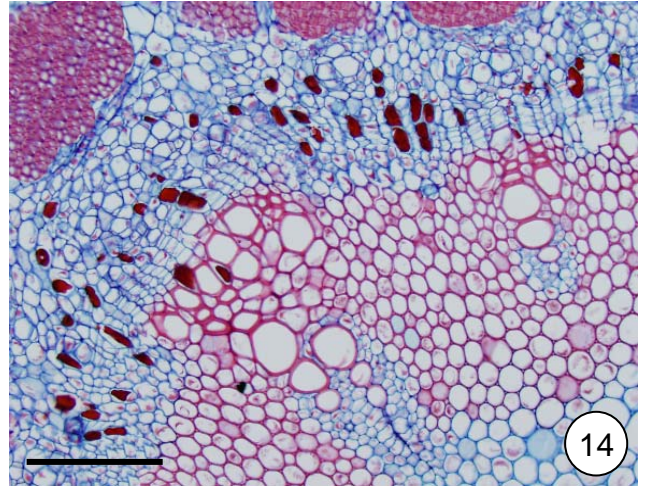
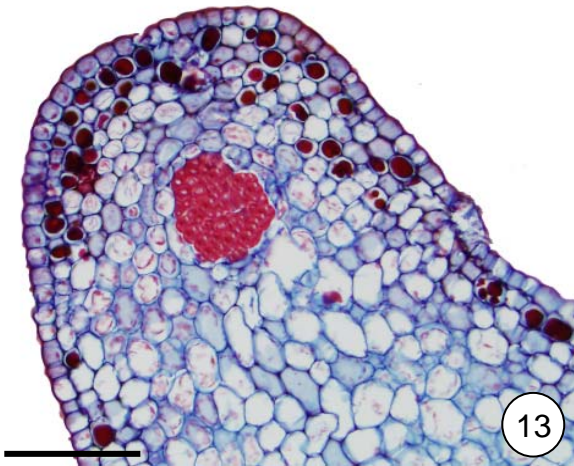
Figuras 1-7. Localização de células com antocianinas em *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims. Secções transversais do segundo ao quarto internó/nó visível de material fresco (1-5); lâmina foliar do quinto nó visível fixada em SFF e diafanizada (6,7). 1. *P. alata*. 2-7. *P. edulis*. Antocianinas na epiderme (5) e camadas subepidérmicas (1-4). 1,2. Caule. 3. Gavinha. 4-7. Lâmina foliar: nervura principal (4,7) e margem (5,6). Barras: 150 μ m (4,6), 75 μ m (1,2,3), 50 μ m (5,7).



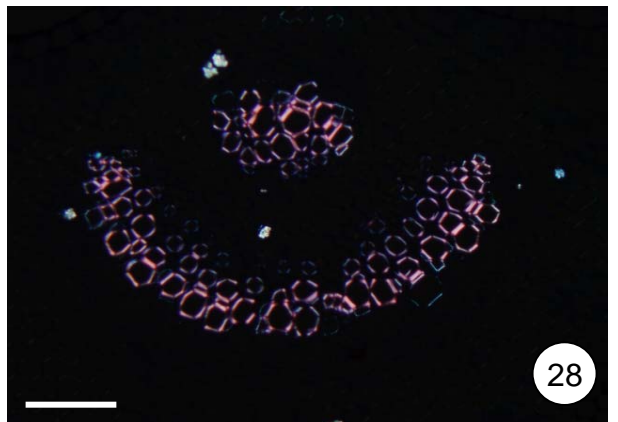
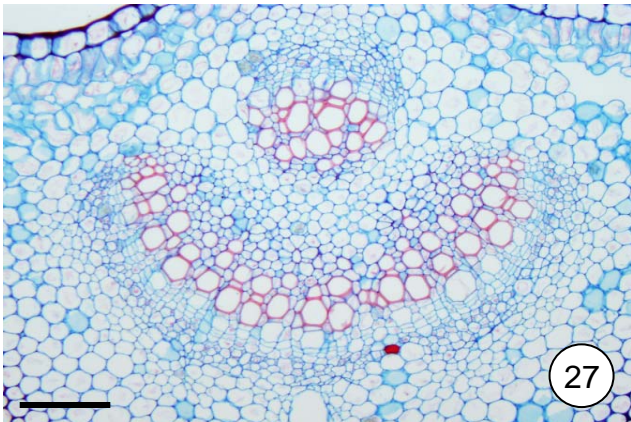
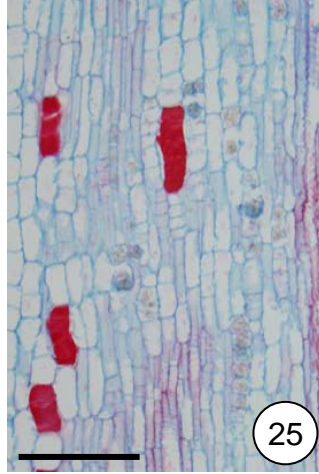
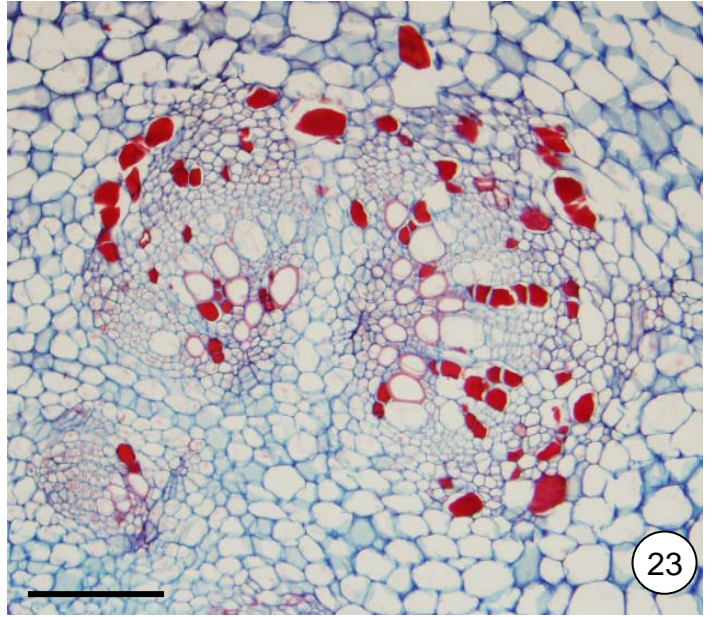
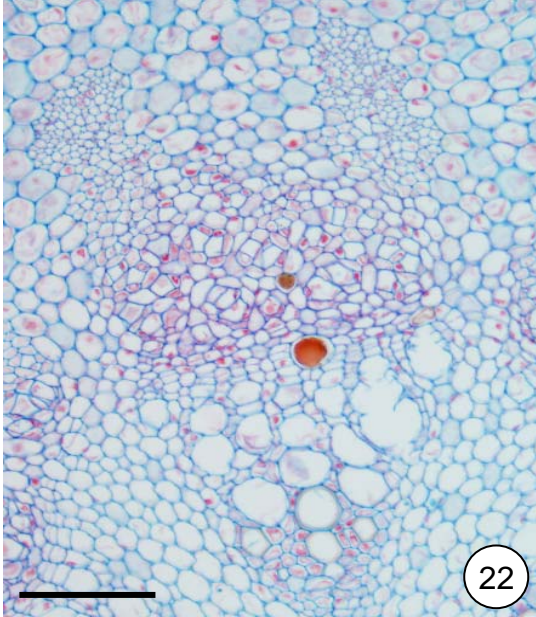
Figuras 8-12. Lâminas foliares fixadas em FAA, diafanizadas e coradas com safranina de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims. Quinto nó visível. 8-10. *P. alata*. 11,12. *P. edulis*. 8-10. Idioblastos secretores de compostos fenólicos: alongados na região costal (8) e curtos na intercostal (9); estes idioblastos são raros próximos aos NEF laminares marginais (10). 11,12. Idioblastos secretores não evidenciados nas nervuras foliares e ausentes na margem. Barras: 150µm (8,11), 75µm (10,12), 50µm (9,11).



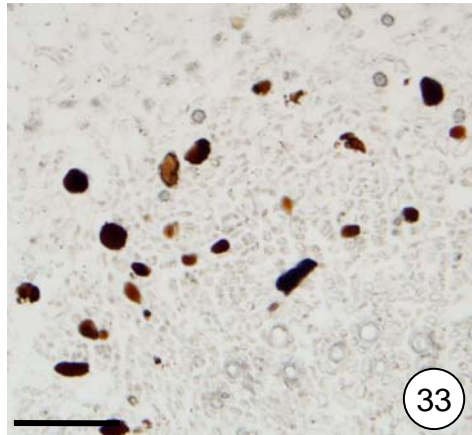
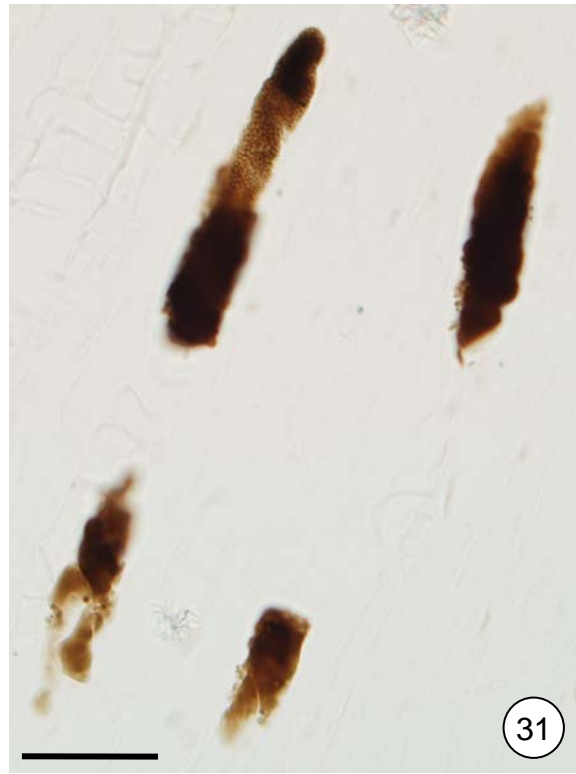
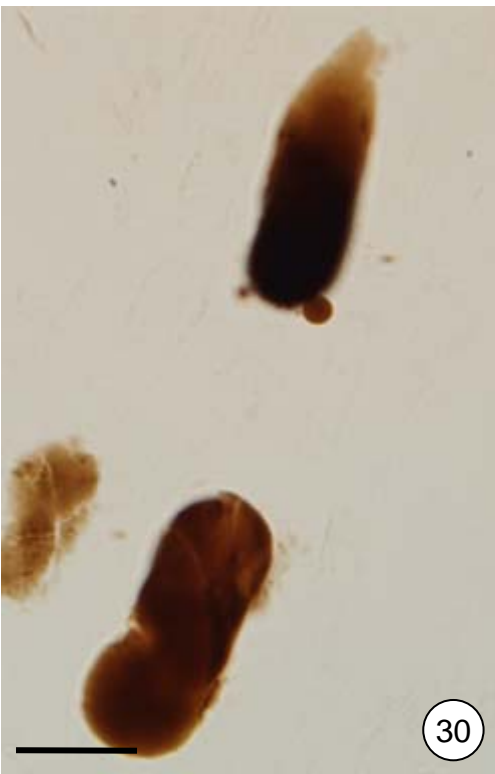
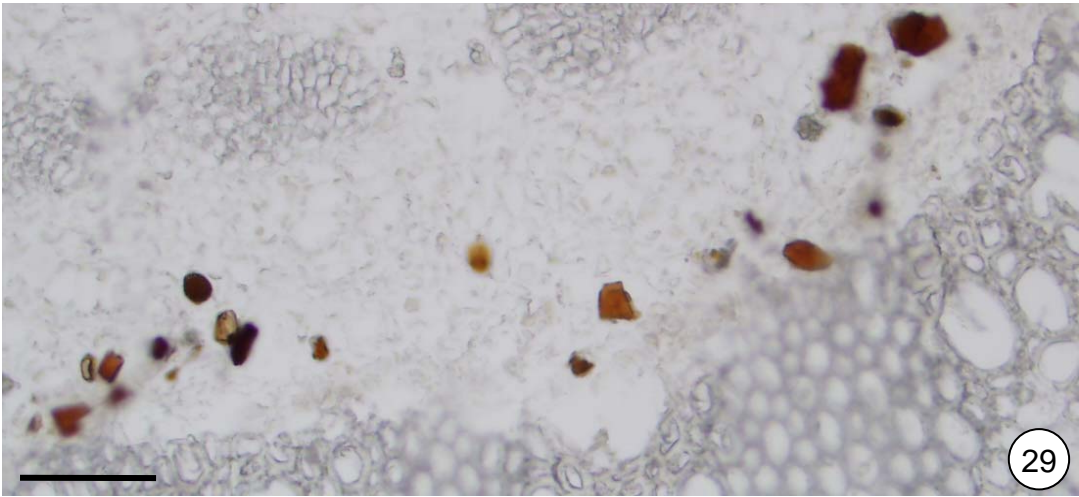
Figuras 13-21. Células com antocianinas e idioblastos secretores de compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis. Secções transversais (13-17, 20,21) e longitudinais (18,19) do terceiro ao quinto internó/nó visível. 13,16. Antocianinas na epiderme e camadas subepidérmicas (16). 14-20. Idioblastos no tecido vascular (14-18,20) e entre as células nectaríferas (19). 13-15. Caule: ala (13), feixe vascular no vértice (14) e entre os vértices (15). 16. Gavinha. 17-21. Folha: pecíolo (17,18), NEF peciolar (19) e nervura principal da lâmina (20,21); notar cristais em luz polarizada (21). Barras: 150µm (19), 75µm (13-17,20,21), 50µm (18).



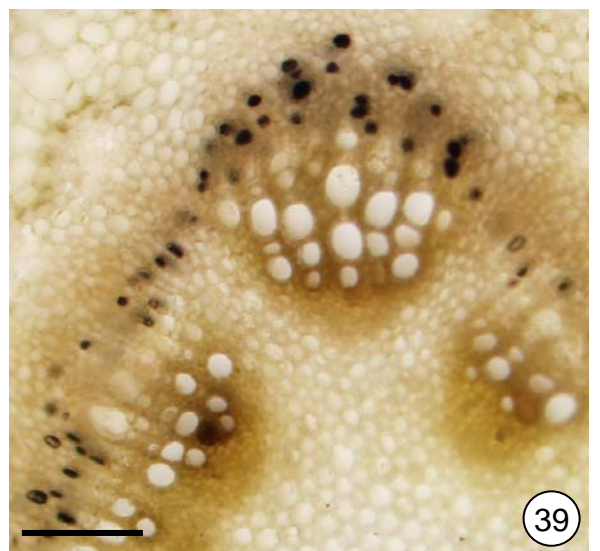
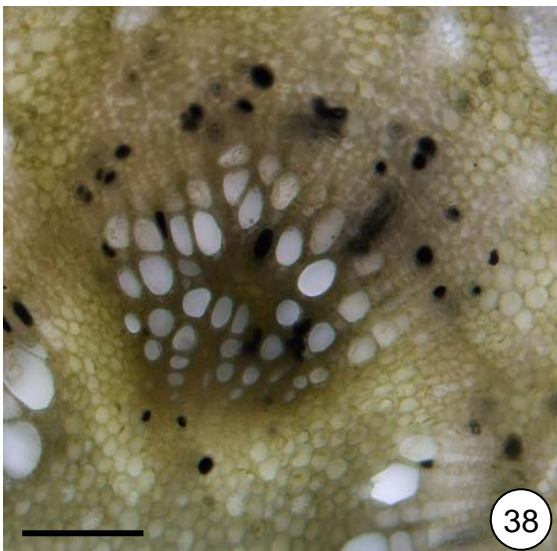
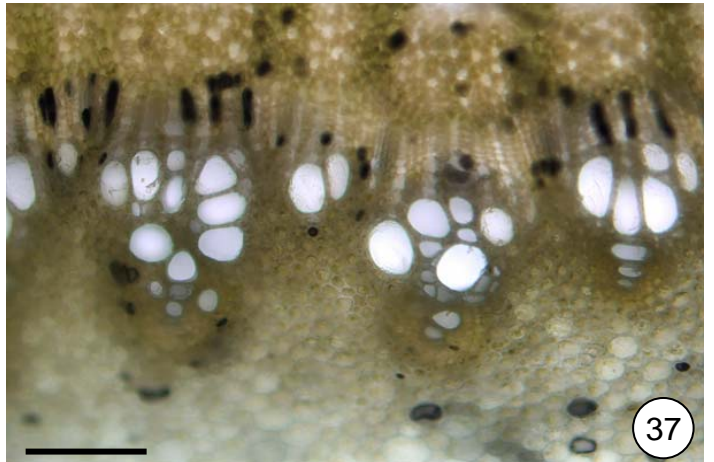
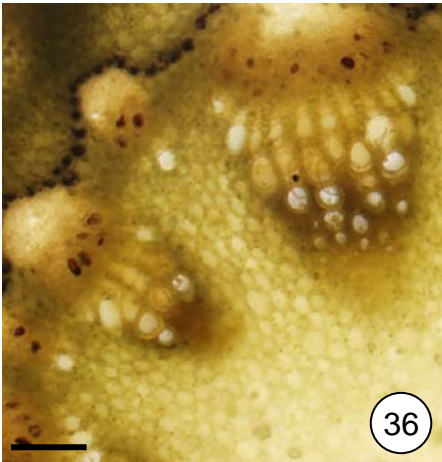
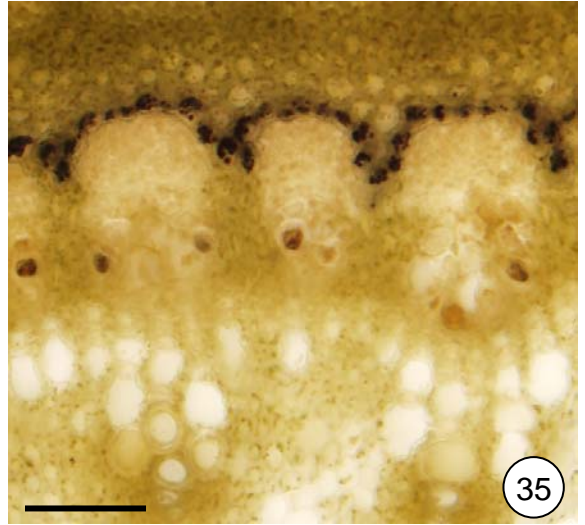
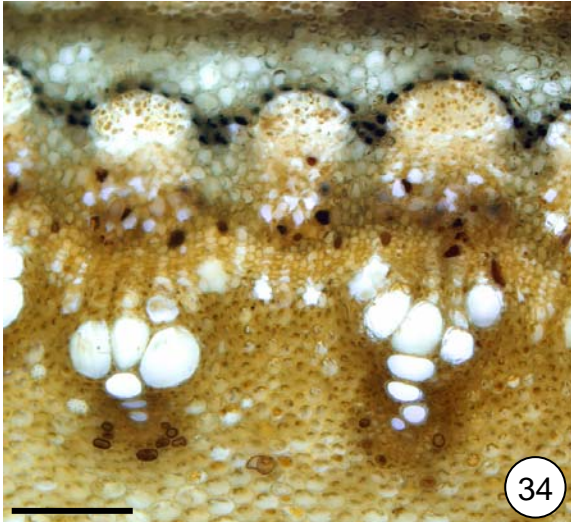
Figuras 22-28. Idioblastos secretores de compostos bioativos nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora edulis* Sims. Secções transversais (22-24,27,28) e longitudinais (25,26) do segundo ao quarto internó/nó visível. 22-25,27. Idioblastos no tecido vascular. 22,24. Caule. 23. Região nodal. 25-28. Idioblastos foliares raros. 25,26. Pecíolo. 27,28. Nervura principal da lâmina foliar. 26,28. Cristais em luz polarizada. Barras: 75µm (22-24,27,28), 50µm (25,26).



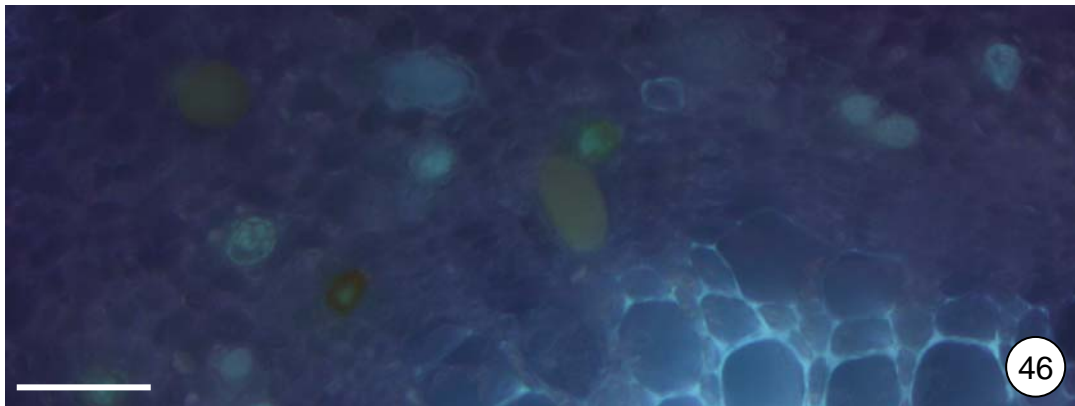
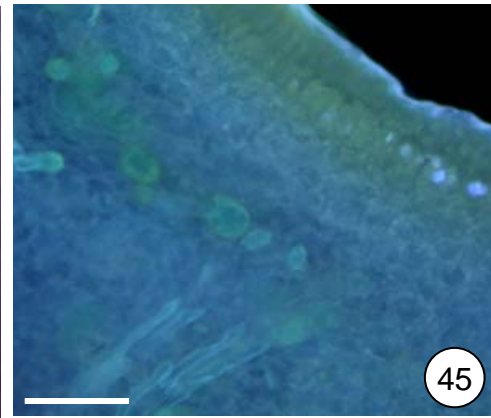
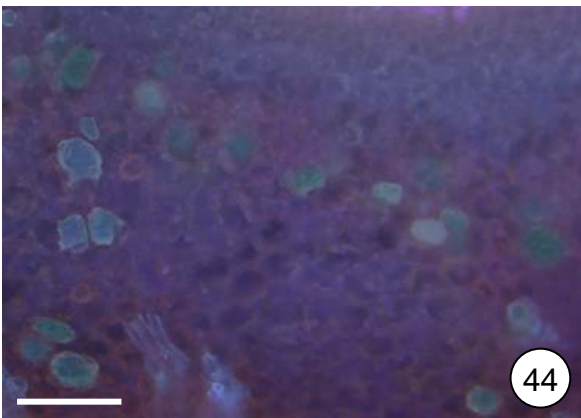
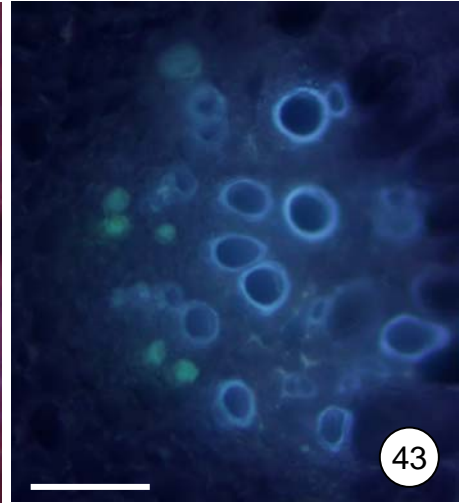
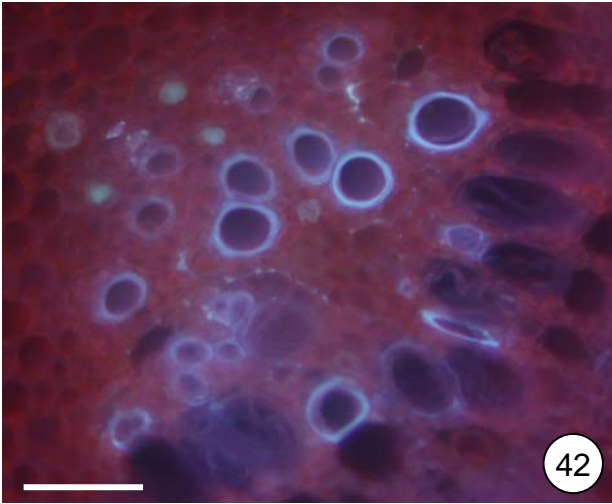
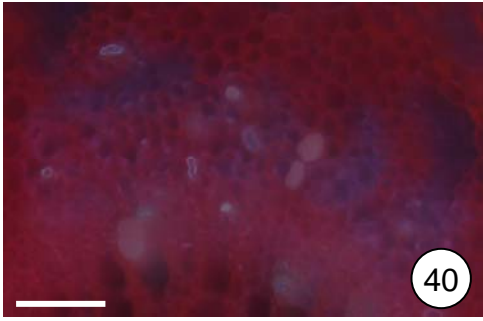
Figuras 29-33. Localização *in situ* de compostos fenólicos nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims. Secções transversais (29,32,33) e longitudinais (30,31) do quarto internó/nó visível. 29-32. *P. alata*. 33. *P. edulis*. 29-33. Idioblastos no tecido vascular (29-31,33) e antocianinas na epiderme e camadas subepidérmicas (32). 29,33. Caule. 30-32. Folha: pecíolo (30,31) e lâmina foliar (32). Barras: 150µm (32), 50µm (29,33), 30µm (30,31).



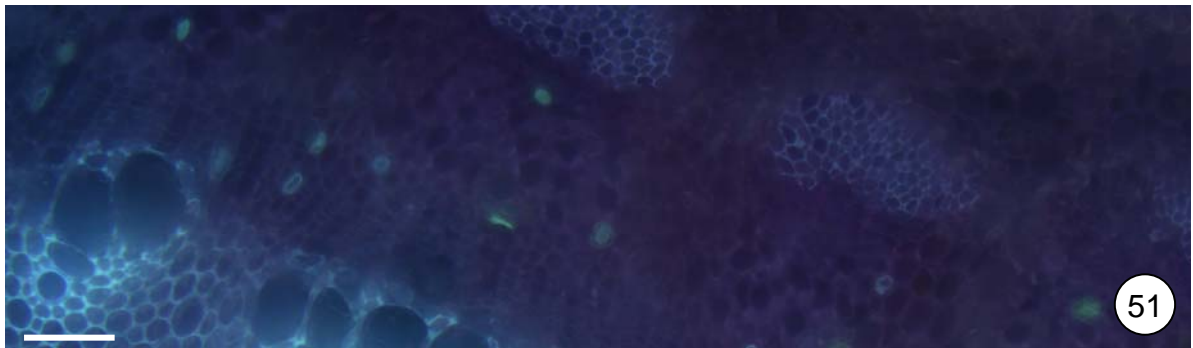
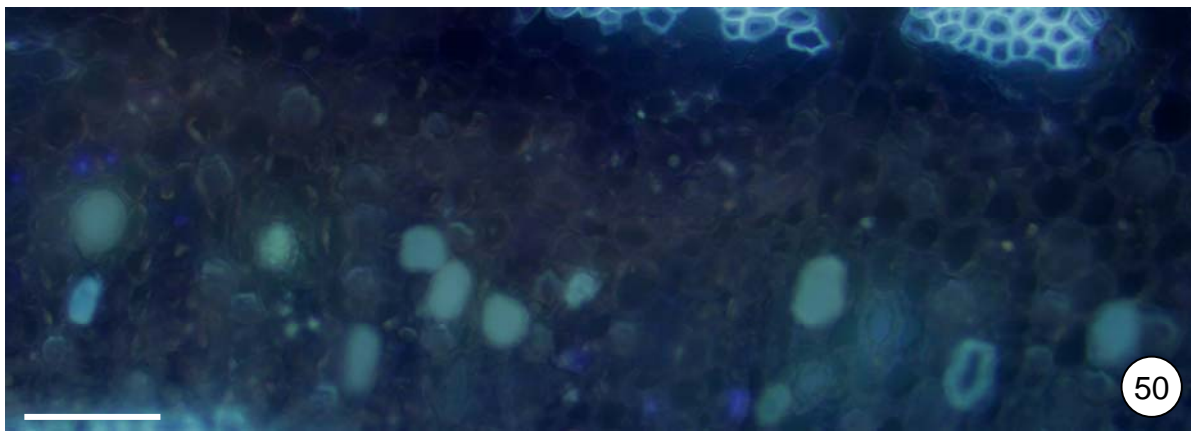
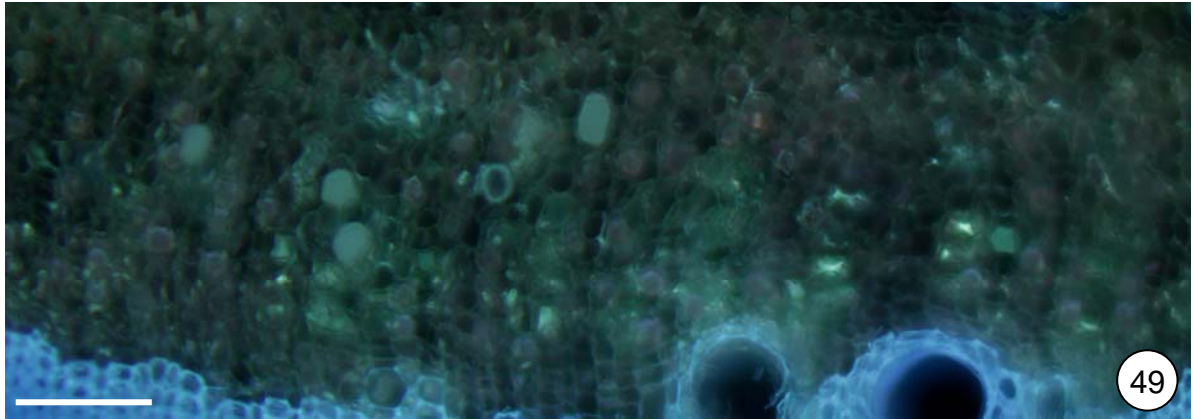
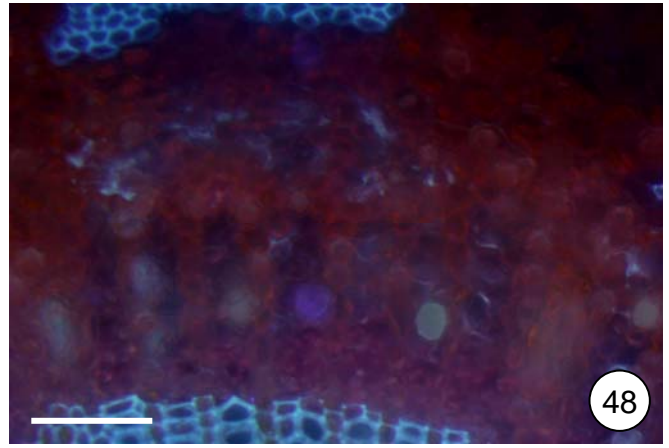
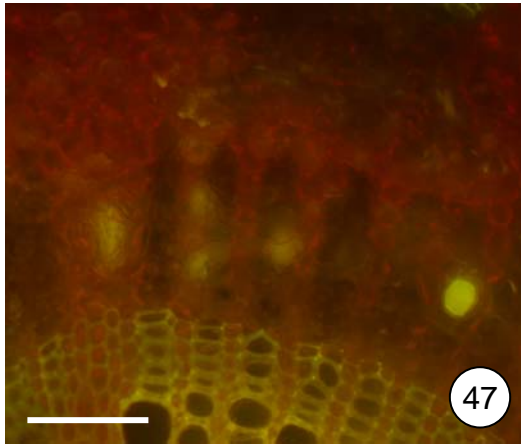
Figuras 34-39. Localização *in situ* de idioblastos secretores de compostos bioativos no caule de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims. Secções transversais do terceiro e quarto internó visível. 34,35,37,38. *P. alata*. 36,39. *P. edulis*. 34-36. Alcalóides evidenciados pelos reagentes de Wagner (34) e Dragendorff (35,36) em material fresco. 37-39. Compostos fenólicos evidenciados em material fixado em SFF. Barras: 50µm.



Figuras 40-46. Localização *in situ* de flavonóides e da atividade antioxidante nos idioblastos secretores de órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis. Secções transversais do terceiro e quarto internó/nó visível. 40,41,46. Caule. 42-45. Folha: pecíolo (42,43) e NEF peciolar (44,45). 40,42,44. Autofluorescência em luz UV. 41,45. Reagente natural A. 43. Cloreto de alumínio. 46. Reagente DPPH. Barras: 50µm.



Figuras 47-51. Localização *in situ* de flavonóides e da atividade antioxidante nos idioblastos secretores do caule de *Passiflora edulis* Sims. Secções transversais do quarto internó visível. 47,48. Autofluorescência em luz azul (47) e luz UV (48). 49. Reagente natural A. 50. Cloreto de alumínio. 51. Reagente DPPH. Barras: 50µm.



Figuras 52,53. Observações em MEV dos compostos fenólicos nos idioblastos de *Passiflora alata* Curtis. Secções transversais do quarto internó/nó visível do caule (52) e NEF peciolar (53). 52. Conteúdo globular no interior do vacúolo (*inset*) nos idioblastos dispersos no floema secundário. 53. Aspecto esponjoso do conteúdo fenólico no idioblasto disperso no parênquima nectarífero (seta longa). Barra: 5µm (53).

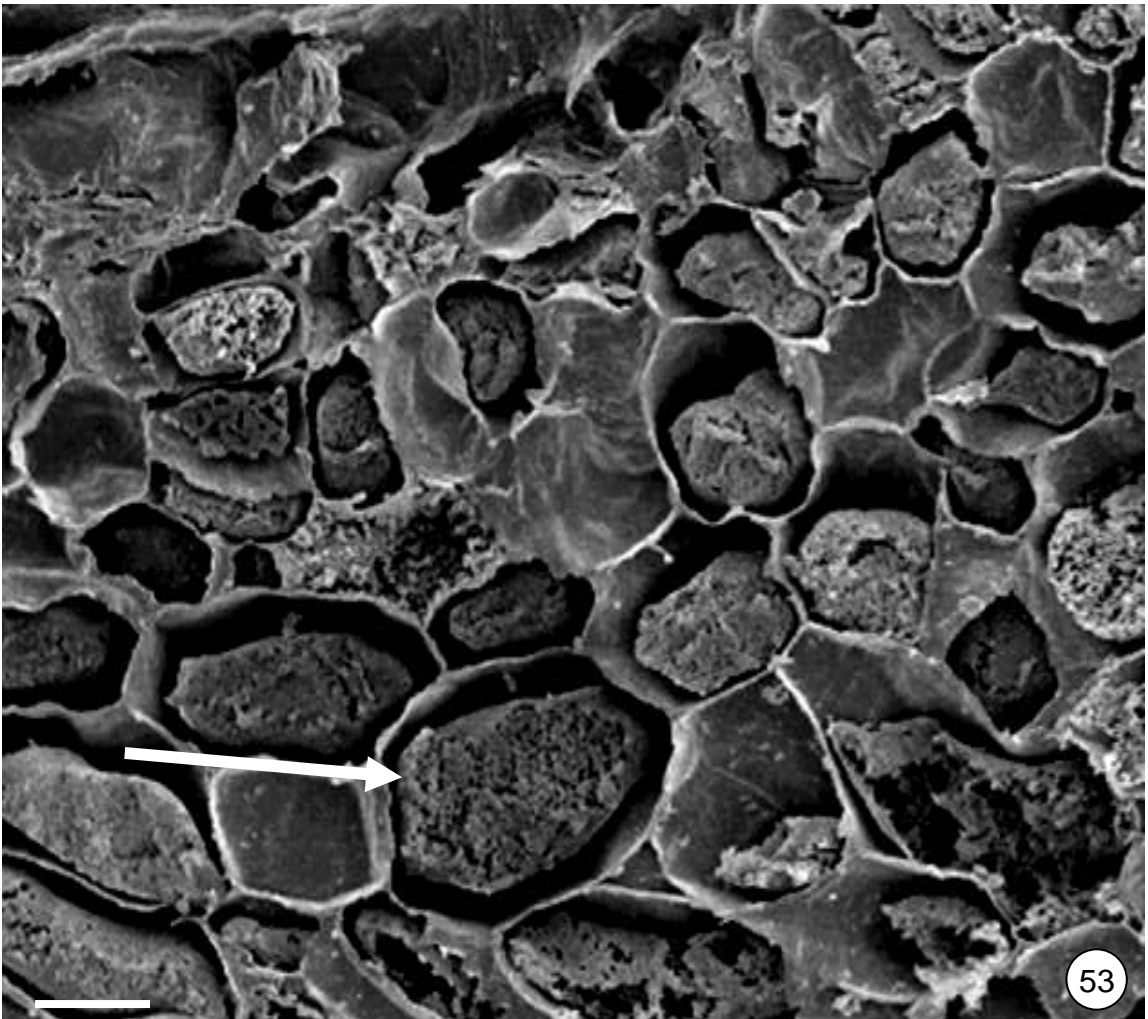
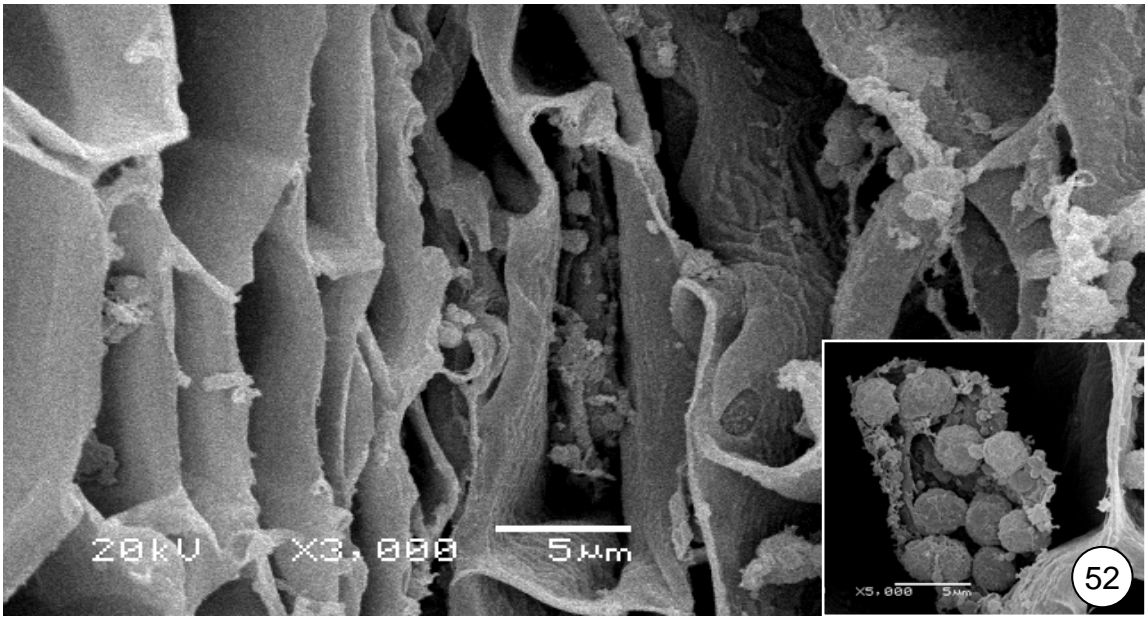
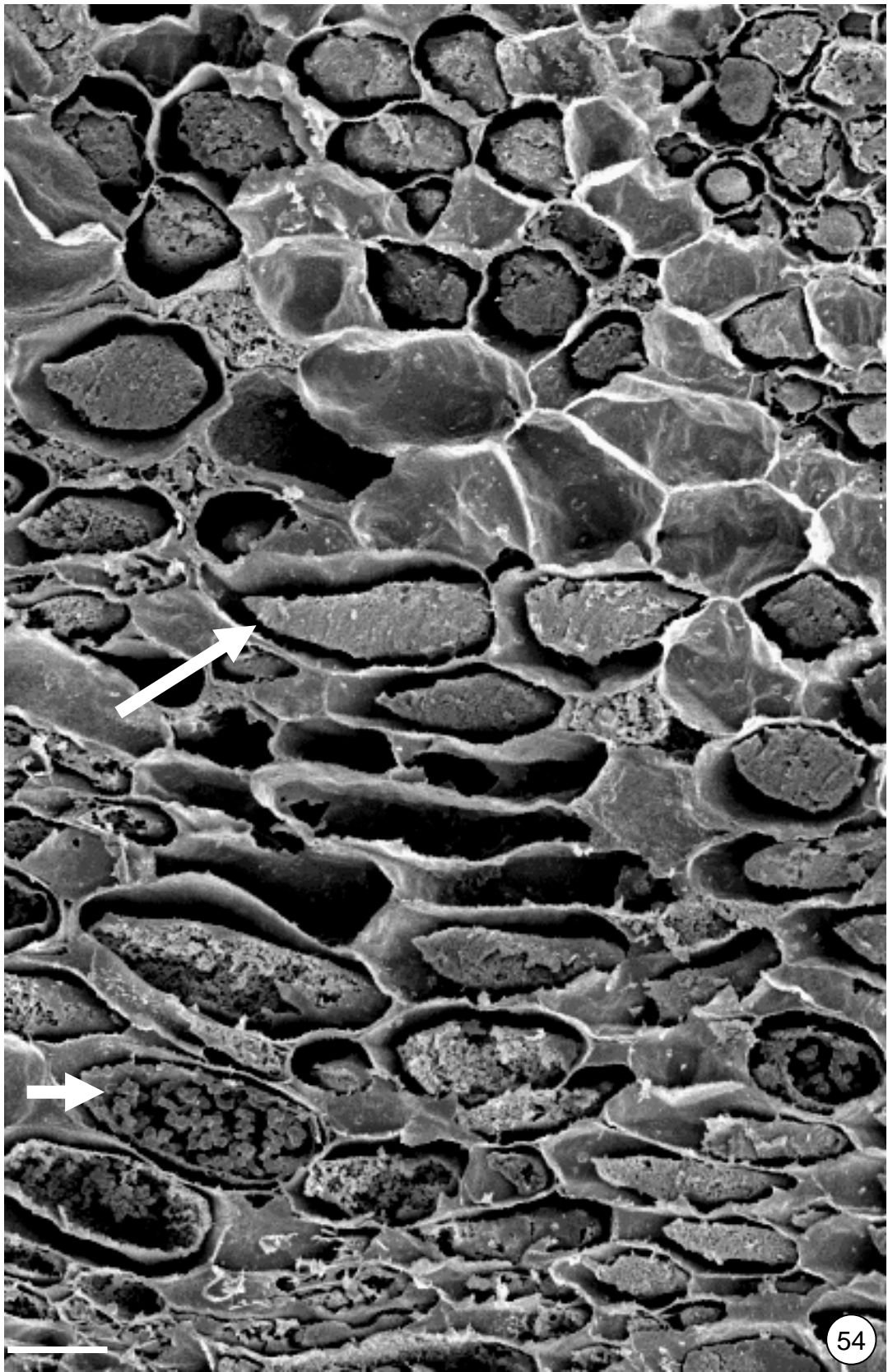


Figura 54. Observação em MEV dos compostos fenólicos nos idioblastos de *Passiflora edulis* Sims. Secção transversal do caule do quarto internó visível. Notar conteúdo esponjoso (seta longa) e globular (seta curta) dos idioblastos. Barra: 5µm.



Discussão

Antocianinas

As antocianinas⁶ são um grupo de flavonóides cuja estrutura química básica é o cátion 2-fenilbenzopirilium com substituições compostas por hidrogênio, hidroxilas ou metoxilas (Swain 1976). Este pigmento é facilmente visualizado em observações morfológicas e nas secções a fresco, devido à coloração púrpura apresentada⁷.

As hidroxilas ligadas aos anéis aromáticos A e C da molécula de antocianina caracterizam grupos fenólicos disponíveis para se complexarem com os íons ferro presentes no fixador SFF. A coloração vinho apresentada pela reação de basofilia entre a safranina e os compostos fenólicos também evidencia este pigmento (Gardner 1975). Desta forma, antes de se iniciar estudos cujo enfoque seja a localização de compostos fenólicos – bioativos ou de senescência – é essencial que se descreva a eventual preexistência de antocianinas nos órgãos-alvo, para evitar eventuais equívocos de interpretação.

Em ambas as espécies, as antocianinas são detectadas apenas nos indivíduos expostos ao sol, independente da época do ano em que foram analisadas. Em *P. alata*, as antocianinas estão restritas às alas do caule e, em *P. edulis*, presentes em todos os órgãos cuja incidência solar é direta. O menor consumo de indivíduos de *P. edulis* expostos ao sol (capítulo 1) por herbívoros é indício da ação deste pigmento como dissuasivo alimentar. Aparentemente, existe uma forte associação entre a biossíntese de antocianinas e situações de estresse na planta (Dixon & Paiva 1995), em que funções

⁶ O termo antocianina refere-se ao glicosídeo, e antocianidina à aglicona (Swain 1976, Zuanazzi & Montanha 2001).

⁷ A cor apresentada pelas antocianinas varia do amarelo ao azul; esta variação está relacionada ao número e orientação dos grupos hidroxila e metoxila presentes na molécula e ao pH do meio, devido ao caráter iônico deste pigmento. As antocianinas são armazenadas no vacúolo das células, que apresenta pH ácido, resultando na coloração púrpura a azul apresentada nas secções (Swain 1976, Taiz & Zeiger 2009).

fisiológicas são atribuídas à presença destes pigmentos, destacando-se a ação contra o excesso de radiação solar, atividade antioxidante e agente antifúngico (Dixon & Paiva 1995, Treutter 2006). Atribui-se função ecológica como dissuasivo alimentar de insetos às antocianinas (Koptur 1992); entretanto, não existe consenso quanto à capacidade dissuasiva destes pigmentos, visto que não são tóxicos à maioria dos invertebrados (Gould & Lister 2006). As evidências de que os insetos evitam consumir plantas com antocianinas estão relacionadas à coloração aposemática apresentada por estas moléculas para alguns folívoros (Gould & Lister 2006, Karageourgou *et al.* 2008).

Compostos bioativos

Os testes histoquímicos localizam estruturas químicas ou ligações específicas nas moléculas, sendo imprescindível o conhecimento dos mecanismos de reação dos testes para a interpretação correta dos resultados.

A localização de alcalóides é baseada na precipitação do iodeto de potássio e átomos de nitrogênio terciário e quaternário, característicos de alguns alcalóides (Svedsen & Verpoorte 1983) como os indólicos presentes em *P. alata* e *P. edulis*. O mecanismo de reação dos testes para a localização de compostos fenólicos baseia-se na precipitação de complexos formados entre íons metálicos – ferro – e hidroxilas fenólicas (Johansen 1940, Goodwin 1976, Vermerris & Nicholson 2006). Os testes para flavonóides apresentam maior especificidade, ligando-se às moléculas pertencentes a diferentes subgrupos desta classe de compostos por meio da formação de complexos com alumínio ou moléculas maiores, como ácido difenil-bórico-etanolamina – constituinte do reagente natural A (Markham 1982).

A síntese dos principais alcalóides e flavonóides presentes em *P. alata* e *P. edulis* – cujas identificações e estruturas químicas estão descritas na introdução geral – é

conhecida e disponível em literatura (Slaytor & McFarlane 1968, Herbert & Mann 1982, Kumazawa *et al.* 2000, Marinova *et al.* 2007). A localização dos sítios de síntese nestas espécies é inviável, devido à baixa concentração e estrutura química dos precursores das moléculas destes compostos. Considerando-se as estruturas e ligações químicas identificadas pelos reagentes supramencionados, os testes aplicados são capazes de localizar os produtos finais da biossíntese dos compostos bioativos, possibilitando a pressuposição dos possíveis locais de translocação e armazenamento.

A detecção de pequenas moléculas como os alcalóides é uma das mais difíceis na microscopia óptica: os fixadores comumente usados liberam as barreiras nas células, permitindo o movimento livre de pequenas moléculas e íons. Assim, existem poucos exemplos de localizações de alcalóides em tecidos e órgãos por meio de testes histoquímicos (Ferreira *et al.* 1998).

Os padrões celulares na biossíntese de alcalóides descritos em literatura envolvem mais de um tipo celular diferenciado, normalmente incluindo estruturas secretoras – idioblastos e/ou laticíferos – na síntese dos precursores finais ou armazenamento dos compostos (DeLuca & St-Pierre 2000, Bird *et al.* 2003, Weid *et al.* 2004, Mahroug *et al.* 2006). A ausência de alcalóides e flavonóides em células meristemáticas e a localização conjunta destes metabólitos em idioblastos dispersos nos tecidos vasculares primários e secundários do caule de ambas as espécies é um forte indício da existência de diferentes tipos celulares diferenciados para a produção destas substâncias em *P. alata* e *P. edulis*. Esta informação deve ser considerada em futuros estudos que abordem a síntese destes compostos em cultura de células indiferenciadas.

A biossíntese de alcalóides apresenta rígido controle celular e tecidual, ocorrendo durante o desenvolvimento dos órgãos jovens e em resposta a estímulos ambientais que influenciam a biossíntese (Bird *et al.* 2003, Mahroug *et al.* 2006). A ocorrência desta classe

de compostos nos tecidos vasculares indica sua translocação à longa distância, de forma análoga à registrada em *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) e *Senecio vernalis* (Asteraceae) (DeLuca & St-Pierre 2000, Moll *et al.* 2002, Bird *et al.* 2003): nestas espécies, as enzimas biossintéticas dos diferentes tipos de alcalóides são sistematicamente translocadas e acumuladas em outros órgãos.

Os alcalóides são compostos que possuem alta toxicidade, apresentando efeito dissuasivo contra herbívoros mesmo em baixas concentrações (Schoonhoven & van Loon 1998). A compartimentalização e armazenamento dos alcalóides no vacúolo são mecanismos que impedem a citotoxicidade destes compostos para a planta (Otani *et al.* 2005). Em *Catharanthus roseus*, os produtos finais da biossíntese dos alcalóides se acumulam no vacúolo da epiderme foliar, onde o papel defensivo é mais efetivamente explorado pelas plantas (Mahroug *et al.* 2006). A concentração de alcalóides em *P. alata* e *P. edulis* corresponde a menos de 0,03% em peso seco das folhas (Copeland & Slaytor 1974, Zuanazzi & Montanha 2001). As evidências de que estes compostos estão presentes nas folhas de ambas as espécies são o acúmulo nos idioblastos dispersos no parênquima nectarífero dos NEF peciolares de *P. alata* e sua detecção no néctar liberado pelos NEF marginais de ambas as espécies e peciolares de *P. edulis* (capítulos 1 e 2).

A diafanização é uma técnica simples e acessível para a visualização da disposição dos idioblastos secretores nos órgãos laminares por possibilitar a observação de toda a extensão da lâmina foliar. A distribuição dos idioblastos de secreção mista nos órgãos foliares de *P. alata* é basípeta, concentrados na base destes órgãos e ausentes no ápice destas estruturas. Este padrão de disposição dos idioblastos é descrito em *Hordeum vulgare* (Poaceae) (Marinova *et al.* 2007) e *Catharanthus roseus* – neste contendo precursores de alcalóides e flavonóides (Mahroug *et al.* 2006). A não-evidência de

idioblastos nas lâminas foliares diafanizadas de *P. edulis* está relacionada às poucas células dispersas nos tecidos vasculares observadas nas secções estruturais.

A autofluorescência dos compostos sob luz azul e UV observados nas secções a fresco é indicativa da presença de flavonóides (Wollenweber & Dietz 1981). Os testes específicos para flavonóides – cloreto de alumínio e reagente natural A – resultaram positivo nas mesmas células em que os compostos fenólicos foram detectados, sugerindo que parte dos resultados em SFF envolva a detecção dos anéis fenólicos constituintes dos compostos bioativos – flavonóides. A facilidade em se detectar estes compostos, em oposição aos alcalóides, decorre da sua concentração nos órgãos aéreos de *P. alata* e *P. edulis* de 4,8mg/100mg e 2,9mg/100mg, respectivamente (Oga *et al.* 1984).

A função dos flavonóides na proteção contra o excesso de radiação solar está relacionada aos diferentes comprimentos de onda absorvidos pelas diversas classes de flavonóides: flavonas e glicosídeos de flavonol apresentam absorção luminosa entre 250-270nm e 330-370nm respectivamente; a presença destes compostos nas lâminas foliares previne a metagênese da timina do DNA e a fotodestruição de co-enzimas como NAD e NADP (Gould & Lister 2006, Treutter 2006). Ainda, oferecem proteção contra diversos tipos de estresse, como herbivoria, altas e baixas temperaturas, infecções, ataque de patógenos, alta intensidade luminosa, ozônio ou deficiência de nutrientes e proteção antioxidante – esta é uma característica dos compostos fenólicos em geral (Harbone 1973, Burchard *et al.* 2000, Optiz 2002, Soares 2002, Doyama *et al.* 2005, Gould & Lister 2006, Treutter 2006, Vermerris & Nicholson 2006).

Os flavonóides, assim como os alcalóides, foram identificados no interior dos idioblastos secretores dispersos entre as células dos tecidos vasculares primários e secundários, majoritariamente entre o floema secundário, indicando uma co-ocorrência destes compostos na translocação pelos tecidos vasculares de *P. alata* e *P. edulis*. A co-

ocorrência de alcalóides e flavonóides em tecidos vasculares é registrada em *Hordeum vulgare* e *Catharanthus roseus* (Mahroug *et al.* 2006, Marinova *et al.* 2007), enquanto a translocação de compostos fenólicos pelo floema é sugerida em *Picea abies* (Pinaceae) (Franceschi *et al.* 1998).

Secções longitudinais do pecíolo coradas com a técnica da dupla coloração e secções do material fixado em SFF evidenciaram conteúdo denso e granuloso dos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são armazenados em um grande vacúolo ou em inúmeros pequenos vacúolos dispersos no citoplasma (Castro & Demarco 2008). Assume-se que os flavonóides solúveis em água⁸ – antocianinas, flavonas e glicosídeos flavonóis estruturalmente relacionados – estejam localizados no interior desta organela (Gould & Lister 2006), normalmente como glicosídeos ou outros conjugados, embora seja desconhecido se estes compostos são sintetizados neste sítio ou transportados de células adjacentes (Dixon & Paiva 1995).

Os idioblastos secretores dispersos no parênquima nectarífero do NEF peciolar de *P. alata* e nos tecidos vasculares do caule de ambas as espécies observados em MEV apresentam conteúdo fenólico de aspecto esponjoso e globular: o conteúdo esponjoso relaciona-se aos flavonóides glicosilados identificados nas secções histológicas como massas coradas densamente; este aspecto em MEV decorre da solubilidade destes compostos no vacúolo. O aspecto globular, observado nas secções histológicas como granuloso, refere-se aos compostos fenólicos de baixo peso molecular ou menos condensados, dispersos em pequenos vacúolos (Franceschi *et al.* 1998).

Propõe-se um padrão espacial de distribuição de alcalóides e flavonóides envolvendo estruturas secretoras, em que os idioblastos são apontados como as

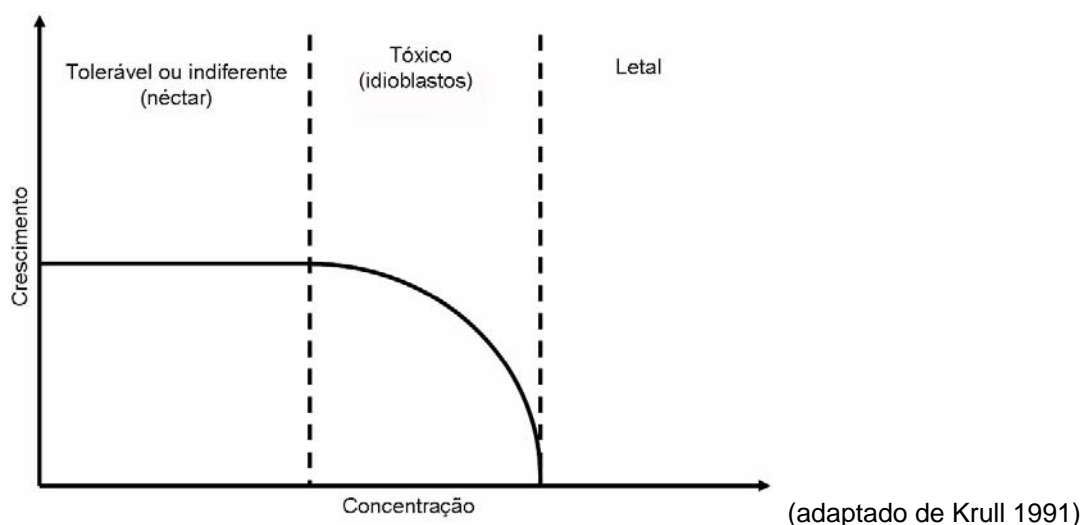
⁸ A presença de radicais hidroxila ou glicosídeos aumenta a solubilidade em água destes compostos; éteres metílicos ou unidades isopentil modificadas conferem caráter lipofílico aos flavonóides (Zuanazzi & Montanha 2001).

principais células envolvidas no armazenamento de compostos bioativos. Estas células dispersas nos tecidos vasculares caulinares de ambas as espécies são as primeiras a receber os compostos bioativos translocados pelos elementos de tubo crivado, enquanto os idioblastos dispersos nas lâminas foliares de ambas as espécies e estipulares de *P. alata* são provavelmente o local de acúmulo destes metabólitos.

Alcalóides e flavonóides foram detectados no néctar proveniente dos NEF foliares de ambas as espécies, à exceção dos NEF peciolares de *P. alata* em que apenas apigenina foi encontrada (capítulos 1 e 2). Embora os testes histoquímicos e a análise em espectrometria de massas (MS) tenham fornecido resultados qualitativos, é possível estabelecer uma relação entre a concentração relativa dos metabólitos no interior da planta e liberado por ela no néctar a partir da sensibilidade que ambas apresentam na detecção dos compostos bioativos: a sensibilidade do MS é da ordem de fentogramas (Souza 2008), possibilitando a detecção de metabólitos em traços, como os presentes no néctar; a histoquímica apresenta uma sensibilidade menor, da ordem de microgramas (Goodwin 1976), detectando compostos em maior concentração. Desta forma, os alcalóides e flavonóides detectados pelos testes histoquímicos estão mais concentrados no interior dos idioblastos presentes em ambas as espécies em comparação ao néctar.

A relação entre a concentração de compostos bioativos disponíveis no interior e fora da planta e o comprometimento no crescimento de herbívoros e/ou coletores é análoga a existente entre a concentração de elementos não-essenciais e o crescimento de seres vivos, explorada na química em estudos de análises de traços e especiação (Krull 1991). Esta correspondência é plotada no gráfico 1.

Gráfico 1. Relação entre a concentração de elementos não-essenciais e o crescimento de insetos.



Os compostos bioativos em alta concentração no interior da planta apresentam função dissuasiva contra herbívoros: os folívoros incapazes de detoxificar estes compostos comprometem o seu desenvolvimento conforme estas substâncias são acumuladas em seu organismo. A baixa concentração de alcalóides e flavonóides no néctar é insuficiente para comprometer o metabolismo dos insetos coletores que estabelecem relações mutualistas com as plantas: o impacto da ingestão destes compostos no desenvolvimento destes insetos é tolerável ou indiferente ao seu crescimento. A análise do gráfico sugere que a modulação da concentração de compostos bioativos em diferentes situações permite à planta se relacionar de maneira distinta com insetos consumidores e mutualistas.

O DPPH é um radical estável, com baixas taxas de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos químicos (Kim *et al.* 2002). O seu uso é comum na detecção *in vitro* da atividade antioxidante de determinados metabólitos, principalmente os flavonóides (Mensor *et al.* 2001). O potencial antioxidante relacionado aos flavonóides presentes no extrato de *P. alata* e *P. edulis* (Rudnicki *et al.* 2007) é evidenciado *in situ* pelo uso do reagente DPPH nas secções histológicas. A atividade antioxidante é detectada nas

mesmas células em que os flavonóides são localizados. As diferentes cores obtidas nas secções são semelhantes às encontradas nos papéis cromatográficos – controle positivo – e correspondem às diversas classes de flavonóides presentes (Mensor *et al.* 2001).

A adaptação do uso do reagente DPPH em secções histológicas vegetais é inédita e pode fornecer indícios destas atividades em plantas cuja descrição farmacológica ainda não está documentada, além de localizar os órgãos-alvo para extrações de compostos antioxidantes com finalidades terapêuticas.

Cristais estão associados aos tecidos vasculares nos órgãos vegetativos aéreos de ambas as espécies. Cristais observados nesta mesma posição são relacionados ao transporte e regulação de cálcio nos tecidos, possivelmente realizado através do xilema (Prychid & Rudall 1999), e a um mecanismo de defesa constitutivo (Damiray 2007).

Referências Bibliográficas⁹

- AKHONDZADEH, S. & MALEKI, J. 2006. Herbal medicines in the treatment of psychiatric and neurological disorders. *Iran Journal of Psychiatry* 1:1-11.
- ASCENSÃO, L., MOTA, L. & CASTRO, M. de M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84:437-447.
- BELSKY, A.J. 1993. Overcompensation by plants: herbivore optimization or red herring? *Evolutionary Ecology* 7:109-121.
- BIRD, D.A., FRANCESCHI, R. & FACCHINI, P.J. 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in *Opium poppy*. *The Plant Cell* 15:2626-2635.
- BURCHARD, P., BILGER, W. & WEISSENBÖCK, G. 2000. Contribution of hidroxcinamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* 25:1373-1380.
- CAISSARD, J.C., JOLY, C., BERGOUGNOUX, V., HUGUENEY, V., MAURIAT, M. & BAUDINO, S. 2004. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Development in Cell Biology* 2:1-15.
- CASTRO, M. de M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3:1273-1284.
- CASTRO, P.C.F., HOSHINO, A., SILVA, J.C. & MENDES, F.R. 2007. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phytotherapy Research* 21:481-484.

⁹ Apresentadas de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica.

- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. 1976. Répartition intracellulire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129:167-174.
- CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. 1997. Antifungal activity of *Solanum* fruit glycoalkaloids: implications for frugivory and seed dispersal. *Ecology* 78:799-809.
- COPELAND, L. & SLAYTOR, M. 1974. The excretion of β -carboline alkaloid harman in passionfruit. *Physiology Plantarum* 31:327-329.
- DAMIRAY, H. 2007. Calcium oxalate crystal of some *Crataegus* (Rosaceae) species growing in Aegean region. *Biologia Bratislava* 62:46-50.
- DeLUCA, V. & ST-PIERRE, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science – Reviews* 5:1360-1385.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001a. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* L. *Journal of Ethnopharmacology* 78:165-170.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001b. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia* 72:922-926.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001c. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* e *P. edulis*. *Fitoterapia* 72:698-702.
- DHAWAN, K., DHAWAN, S. & SHARMA, A. 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94:1-23.
- DIXON, R.A. & PAIVA, N.L. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.
- DOYAMA, J.T., RODRIGUES, H.G., NOVELLI, E.L.B., CEREDA., E. & VILEGAS., W. 2005. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Etnopharmacology* 96:371-374.

- FACCHINI, P.J. 2005. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:29-66.
- FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31:37-75.
- FERREIRA, J.F.S., DUKE, S.O. & VAUGHN, K.C. 1998. Histochemical and immunocytochemical localization of tropane alkaloids in *Erythroxylum coca* var. *coca* and *E. novogranatense* var. *novogranatense*. *International Journal of Plant Sciences* 159:492-503.
- FOWLER, M.W. 1981. Plant cell biotechnology to produce desirable substances. *Chemistry and Industry* 4:229-233.
- FRAENCKEL, G.S. 1959. The *raison d'être* of secondary plant substances. *Science* 129:1466-1470.
- FRANCESCHI, V.R., KREKLING, T., BERRYMAN, A.A. & CHRISTIANSEN, E. 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reaction. *American Journal of Botany* 85:601-615.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159.
- GAHAN, P.B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry*. Academic Press, London.
- GARDNER, R.O. 1975. Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology* 50:315-317.
- GERLACH, G. 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GERSBACH, P.V., WYLLIE, S.G. & SARAFIS, V. 2001. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany* 88:521-525.

- GOODWIN, T.W. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press Inc, London.
- GOULD, K.S. & LISTER, C. 2006. Flavonoid function in plants. *In* Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, p.397-441.
- GRAEFF, F.G.N. & GUIMARÃES, F.S. 1999. Fundamentos de psicofarmacologia. Editora Atheneu, São Paulo.
- HARBONE, J.B. 1973. Phytochemical methods. Chapman and Hall, New York.
- HERBERT, R.B. & MANN, J. 1982. The biosynthesis of the beta carboline alkaloids harman and eleagnine. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* 11982:1523-1525.
- IWASHINA, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113:287-299.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Books, New York.
- KARAGEORGOU, P., BUSCHMANN, C. & MANETAS, Y. 2008. Red leaf color as a warning signal against insect herbivory: honest or mimetic? *Flora* 203:648-652.
- KIM, J.K., NOH, J.H., LEE, S., CHOI, J.S., SUH, H., CHUNG, H.Y., SONG, Y.O. & CHOI, W.C. 2002. The first total synthesis of dihydroxybenzyl methyl ether and its antioxidant activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23:661-662.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. *In* *Insect-plant interactions* (E. Bernays, ed.). CRC Press, Boca Raton, p.81-129.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica.
- KRULL, I.S. 1991. Trace metal analysis and speciation. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

- KUMAZAWA, T., MINATOGAWA, T., MATSBA, S., SATO, S. & ONODERA, J.I. 2000. An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glucosylflavone. *Carbohydrate Research* 329:507-513.
- KUTCHAN, T.M. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8:292-300.
- LILLIE, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. McGraw Hill, New York.
- LINDSEY, K. & YEOMAN, M.M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 34:1055-1065.
- LUTOMSKI, J. & MALEK, B. 1975. Pharmacochemical investigations on raw materials genus *Passiflora*. 3. Phytochemical investigations on the raw materials of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Planta Medica* 27:222-225.
- LUTOMSKI, J., MALEK, B. & RYBACKA, L. 1975. Pharmacochemical investigations of the raw materials from *Passiflora* genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Planta Medica* 27:111-121.
- LUTOMSKI, J., MALEK, B. & STACHOWIAK, Z. 1974. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. 1. New method of chromatographic separation and fluorometric-planimetric determination of alkaloids and flavonoids in harman raw materials. *Planta Medica* 26:311-317.
- MAHROUG, S., COURDAVAULT, V., THIERSAULT, M., St-PIERRE, B. & BURLAT, V. 2006. Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta* 223:1191-1200.
- MARINOVA, K., KLEINSCHMIDT, K., WEISSENBOCH, G. & KLEIN, M. 2007. Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* 144:432-444.

- MARKHAM, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., SANTOS, T.C., COUBE, C.S. & LEITÃO, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15:127-130.
- MOLL, S., ANKE, S., KAHMANN, V., HANSCH, R., HARTMANN, T. & OBER, D. 2002. All-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhyprisine synthase. *Plant Physiology* 130:47-57.
- MOLYNEUX, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:211-219.
- NI, X.L., PENG, L. & LIU, W.Z. 2007. Structures, components and functions of secretory tissues in *Houttuynia cordata*. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:1734-1745.
- OGA, S., FREITAS, P.C., SILVA, A.C.G. & HANADA, S. 1984. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica* 50: 303-306.
- OPITZ, S. 2002. Phenylphenalenones and related phenolic pigments of the Haemodoraceae: structure, biosynthesis and accumulation patterns in *Xiphidium caeruleum* and *Wachendorfia thyrsiflora*. Tese de doutorado, Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Alemanha.
- OTANI, M., SHITAN, N., SAKAI, K., MARTINOIA, E., SATO, F. & YAZAKI, K. 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138:1939-1946.
- OTOBONE, F.J., MARTINS, J.V.C., TROMBELLI, M.A., ANDREATINI, R. & AUDI, E.A. 2005. Anxiolytic and sedative effects of a combined extract of *Passiflora alata* Dryander and *Valeriana officinalis* L. in rats. *Acta Science of Health Sciences* 27:145-150.

- PETRY, R.D., REGINATTO, F., PARIS, F., GOSMANN, G., SALGUEIRO, J.B., QUEVEDO, J., KAPCZINSKI, F., ORTEGA, G.G. & SCHENKEL, E.P. 2001. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *P. edulis* leaves. *Phytotherapy Research* 15:162-164.
- PRYCHID, C.J. & RUDALL, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84:725-739.
- REHWALD, L.A., MEIER, B. & STICHER, O. 1994. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 69:153-158.
- RUDNICKI, M., OLIVEIRA, M.R., PEREIRA, T.V., REGINATTO, F.H., DAL-PIZZOL, F. & MOREIRA, J.C.F. 2007. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry* 100:719-724.
- SCHNITZLER, J.P., JUNGBLUT, T.P., HELLER, W., KOFEERLEI, M., HUTZLEK, P., HEINZMANN, U., SCHMELZER, E., ERNST, D., LANGEBARTELS, C. & SANDERMANN, H. 1996. Tissue localization of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist* 132:247-258.
- SCHOONHOVEN, L.M. & van LOON, J.J.A. 1998. Ecology: living apart together. *In* *Insect-plant biology: from physiology to evolution* (L.M. Schoonhoven & J.J.A. van Loon, eds.). Chapman & Hall, London, p.189-259.
- SHOBE, W.R. & LERSTEN, N.R. 1967. A technique for clearing gymnosperm leaves. *Botanical Gazette* 127:150-152.
- SLAYTOR, M. & McFARLANE, I.J. 1968. The biosynthesis and metabolism of harman in *Passiflora edulis*. I. The biosynthesis of harman. *Phytochemistry* 7:605-611.
- SOARES, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* 15:71-81.

- SONAGLIO, D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P.R. & BASSANI, V.L. 2007. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *In* Farmacognosia: da planta ao medicamento (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, eds.). UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p.291-326.
- SOUKUPOVÁ, J., CVIKROPOVÁ, M., ALBRECHTOVÁ, J., ROCK, B.N. & EDER, J. 2000. Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytologist* 146:403-414.
- SOUZA, L.M. 2008. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SVEDSEN, A.B. & VERPOORTE, R. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Co., New York.
- SWAIN, T. 1976. Nature and properties of flavonoids. *In* Chemistry and biochemistry of plant pigments (T.W. Goodwin, ed.). Academic Press Inc., London, p.425-463.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2009. *Fisiologia vegetal*. Artmed, Porto Alegre.
- TATTINI, M., GALARDI, C., PINELLI, P., MASSAI, R., REMORINI, D. & AGATI, G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163:547-561.
- TATTINI, M., GRAVANO, E., PINELLI, P., MULINACCI, N. & ROMANI, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148:69-77.
- TATTINI, M., GUIDI, L., BONZI, L.M., PINELLI, P., REMORINI, D., INNOCENTI, E.D., GIORDANO, C., MASSAI, R. & AGATI, G. 2005. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytologist* 167:457-470.

- TREUTTER, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4:147-157.
- VALETTE, C., ANDARY, C., GEIGER, T.P., SARAH, J.L. & NICOLE, M. 1998. Histochemical and citochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopathology* 88:1141-1148.
- VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. 2006. Phenolic compounds biochemistry. Springer, The Netherlands.
- WEID, M., ZIEGLER, J. & KUTCHAN, T.M. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:13957-13962.
- WOLLENWEBER, E. 1982. Flavonoids. *In* Flavonoids: advances and research (J.B. Harbone & T.J. Mabry, eds.). Chapman and Hall, London, p.189-259.
- WOLLENWEBER, E. & DIETZ, V.H. 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20:869-932.
- YODER, L.R. & MAHLBERG, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63:1167-1173.
- ZIEGLER, J. & FACCHINI, P.J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59:735-769.
- ZUANAZZI, J.A.S. & MONTANHA, J.A. 2001. Flavonóides. *In* Farmacognosia: da planta ao medicamento (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, eds.). UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p.577-614.

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma grande variedade de substâncias de reconhecido valor medicinal e econômico pode ser produzida por células secretoras especializadas (Fahn 1979, 2000). O valor dos compostos produzidos pelas estruturas secretoras também é biológico, uma vez que conferem propriedades às espécies de sobreviverem às condições climáticas e à fauna, constituindo-se em defesas químicas (Taiz & Zeiger 2009). Atualmente, as estruturas secretoras revelam-se as responsáveis pela produção/armazenamento de compostos bioativos, e ressurgem com destaque em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas que apresentam importância farmacológica.

A crescente procura de mercado pelos produtos naturais, em detrimento dos sintéticos, reforça o ressurgimento da pesquisa acadêmica voltada às demandas sócio-econômicas. Um exemplo deste enfoque interdisciplinar que atendeu à população de baixa renda foi o esforço congregado na pesquisa da artemisinina – um derivado sesquiterpênico obtido de órgãos aéreos primários de *Artemisia annua* L. – que substituiu com eficácia os antimaláricos sintéticos, para os quais *Plasmodium falciparum* já é resistente. Estudos morfológicos e fitoquímicos de mutantes de *A. annua* possibilitaram localizar o sítio de síntese da artemisinina: os tricomas secretores bisseriados capitados (Duke *et al.* 1994).

Neste contexto, os estudos tentam explicar a baixa quantidade de compostos bioativos obtidos a partir de plantas cultivadas em condições ideais e a inviabilidade na produção de muitos fármacos em cultura de células (Fowler 1981, Lindsey & Yeoman 1983). Em ambos os casos, as estruturas secretoras estão envolvidas, produzindo ou liberando compostos apenas quando a planta está submetida a algum estresse ou em padrões de biossíntese que envolvam diferentes tipos celulares já diferenciados. Os

alcalóides e flavonóides encontrados em *P. alata* e *P. edulis* parecem seguir este modelo: os testes localizaram estes compostos apenas nos tecidos que apresentavam certo grau de diferenciação; os ápices caulinares vegetativos cujos tecidos são ainda meristemáticos estão desprovidos dos produtos finais da síntese destes metabólitos.

Relações ecológicas em *Passiflora*

Os vegetais produzem diversos compostos químicos, referidos como metabólitos secundários, em resposta a uma ampla variedade de organismos herbívoros, os principais responsáveis pelo impacto negativo na aptidão das plantas (Belsky 1993, Cipollini & Levey 1997). Apesar da existência de evidências indiscutíveis desta suposição, críticos enfatizam que muitas substâncias do metabolismo secundário apresentam outras funções adicionais na planta; argumenta-se que o papel defensivo destes compostos pode ser simplesmente um efeito pleiotrópico de genes que controlam os fatores de resistência que foram selecionados em resposta a outros estresses ambientais, como a competição entre plantas co-específicas e hetero-específicas – síntese de compostos fenólicos que conferem efeitos alelopáticos –, deficiência nutricional – p. ex, alcalóides como reserva de nitrogênio –, e proteção contra radiação UV pelos flavonóides (Schoonhoven & van Loon 2008). Em algumas plantas, a biossíntese destes compostos está diretamente relacionada aos fatores bióticos e abióticos que promovem estresse na planta, sendo sintetizados apenas na presença destes estímulos (Fahn 1988, Dixon & Paiva 1995, Franceschi *et al.* 1998).

A antocianina é um exemplo de composto químico cujas funções fisiológicas são reconhecidas – proteção contra radiação UV excessiva, manutenção da integridade do protoplasto, antioxidante e antifúngico (Dixon & Paiva 1995, Treutter 2006, Taiz & Zeiger 2009). Adicionalmente, as antocianinas destacam-se no contexto ecológico como defesas

constitutivas que atuam sobre o herbívoro e são moduladas pelas plantas (Koptur 1992): evidências sugerem que os insetos evitam o consumo de plantas com este pigmento.

A hipótese mais aceita para legitimar as antocianinas como defesas anti-herbívoria refere-se à coloração aposemática apresentada pelas plantas que possuem este pigmento, inibindo os folívoros que não reconhecem a cor vermelha (Gould & Lister 2006, Karageorgou *et al.* 2008). Em *P. edulis*, os indivíduos expostos ao sol são menos consumidos em relação aos sombreados, sendo este um forte indício da função ecológica atribuída a estes pigmentos, principalmente se considerado que borboletas do gênero *Heliconius* não apresentam sensibilidade aos comprimentos de onda relativos a cor vermelha (Crane 1955) e podem não reconhecer os órgãos jovens preferenciais para a oviposição.

A presença de compostos bioativos – alcalóides e compostos fenólicos – está diretamente relacionada a uma estratégia de defesa em *P. alata* e *P. edulis*. As defesas químicas produzidas em *Passiflora* incluem alcalóides, flavonóides e glicosídeos cianogênicos, envolvidos nas respostas contra herbívoros e patógenos (Benson *et al.* 1975, Brown 1981, Stephenson 1982, Spencer 1988, Verpoorte & Schripsema 1994, Trigo 2000).

Experimentos de preferência alimentar realizados com borboletas especialistas do gênero *Heliconius* e *Osmilia flavolineata*, uma espécie de gafanhoto generalista, evidenciam que as larvas de *Heliconius* selecionam folhas jovens e meristemáticas de espécies de *Passiflora*, enquanto os adultos de *O. flavolineata* não apresentam preferências entre folhas jovens ou completamente expandidas (Denno & Donnelly 2008). Desta forma, os compostos químicos dissuasivos são mais eficientes contra herbívoros generalistas e devem estar disponíveis em todos os órgãos aéreos da planta, justificando a mobilização de alcalóides e flavonóides pelos tecidos vasculares de *P. alata* e *P. edulis*.

A relação entre a concentração de compostos bioativos – alcalóides e/ou compostos fenólicos – disponíveis nos idioblastos e no néctar afeta distintamente o crescimento de herbívoros e coletores. Esta relação foi plotada no gráfico de crescimento de insetos *versus* a concentração dos compostos tóxicos (capítulo 3), sugerindo que uma baixa concentração de compostos tóxicos, como disponibilizada no néctar, pouco afeta ou é indiferente aos insetos coletores – à exceção de alguns pilhadores (Adler 2001, Adler & Irwin 2005); no entanto, a alta concentração dos compostos tóxicos no interior da planta, como nos idioblastos secretores presentes no caule de ambas as espécies, afeta diretamente o crescimento do folívoros. Assim, a modulação na concentração de compostos no interior e fora da planta é uma forma dela relacionar-se com insetos antagonistas e mutualistas.

De acordo com a teoria coevolutiva (Ehrlich & Raven 1964), uma sucessão de defesas químicas contra herbívoros é desenvolvida ao longo do tempo evolutivo; estas defesas são eficazes contra insetos generalistas, enquanto os especialistas desenvolvem mecanismos de detoxificação e estratégias para a exclusão dos generalistas.

Os idioblastos secretores – cuja secreção heterogênea é composta por alcalóides e flavonóides – foram identificados majoritariamente no caule de ambas as espécies (capítulo 3). A presença de compostos bioativos em uma estrutura secretora comum a *P. alata* e *P. edulis* evidencia que ambas possuem a mesma estratégia química contra insetos generalistas e denotam a presença de idioblastos secretores no caule como um caráter conservativo. As folhas, no entanto, apresentam diversas adaptações morfológicas diretamente atuantes na defesa contra insetos especialistas – borboletas Heliconiini. Estas alterações, taxonomicamente identificadas como caracteres distintivos, são um reflexo das diferentes estratégias morfológicas adotadas por estas plantas contra seus herbívoros primários, cuja finalidade é a defesa direta ou indireta destas espécies contra folívoros,

representando adaptações morfológicas para limitar o impacto negativo da herbivoria (Wäckers *et al.* 2001).

Ao longo do tempo evolutivo, as borboletas da tribo Heliconiini desenvolveram estratégias fisiológicas para detoxicar ou seqüestrar os compostos tóxicos presentes em *Passiflora* (Spencer 1988, Trigo 2000) e usá-los em sua defesa contra seus predadores, tornando-se impalatáveis. A detoxicação ocorre pela presença de enzimas que inativam os compostos tóxicos no organismo dos insetos especialistas (Spencer 1988). O seqüestro de alcalóides é descrito em lagartas e adultos de *Heliconius ismenius* a partir de sua planta hospedeira, *Passiflora costaricensis* (seção Xerogona, Ulmer & MacDougal 2004); entretanto, o papel destes alcalóides na defesa química de espécies de *Heliconius* ainda é desconhecido (Trigo 2000).

As alterações no comportamento do herbívoro a partir de estratégias morfológicas e defesas bióticas possuem maior influência sobre o curso da evolução entre borboletas Heliconiini e *Passiflora* em detrimento à presença de compostos químicos defensivos (Benson 1978, Williams & Gilbert 1981).

Espécies de *Passiflora* de ambientes neotropicais desenvolveram estratégias morfológicas mais eficientes contra as borboletas Heliconiini em resposta à neutralização dos compostos tóxicos (Denno & Donnelly 2008): a presença de tricomas tectores de ápice agudo sobre as nervuras da lâmina foliar de *P. edulis*, nectários extraflorais (NEF) para a atração de formigas agressivas e estabelecimento de relações mutualistas, e o desenvolvimento de *egg mimics*, estruturas que mimetizam ovos de borboletas Heliconiini.

Alguns caracteres estruturais presentes na superfície das plantas possuem a função de oferecer resistência ao ataque de herbívoros; sugere-se que estas defesas são seletivas em sua interação com antagonistas específicos e geralmente evoluem após o surgimento de uma série de defesas químicas. Considerando-se a capacidade das

borboletas do gênero *Heliconius* de detoxicar os compostos produzidos por espécies de *Passiflora* (Trigo 2000), o desenvolvimento de estratégias morfológicas torna-se essencial para a manutenção da aptidão destas espécies. *P. adenopoda* é uma espécie que apresenta tricomas tectores por todo o corpo da planta; estas estruturas provêm defesas contra larvas de borboletas Heliconiini, por meio de injúrias na superfície do corpo das larvas (Gilbert 1971). Entretanto, caracteres de superfície foliar são vulneráveis a herbívoros pequenos o suficiente para se alimentarem entre as estruturas: em *Lactuca serriola* (Asteraceae), os feixes vasculares são protegidos por uma coluna de tricomas tectores semelhantes aos encontrados em *P. edulis* (introdução geral); estes tricomas são removidos pelas lagartas antes de consumirem a folha (Dussourd & Denno 1991).

A produção de nectários extraflorais é análoga à de compostos químicos do metabolismo secundário que atuam como dissuasivo aos herbívoros, visto que a presença de formigas reduz a pressão de herbivoria (Janzen 1968). Em espécies tropicais de *Acacia* (Fabaceae), plantas que possuem NEF não produzem compostos do metabolismo secundário, enquanto estas substâncias são disponibilizadas pelas espécies que não apresentam glândulas nectaríferas (Knox *et al.* 1985). O custo relativamente baixo da produção de nectários extraflorais – 1% da energia total em algumas espécies – sugere que este mecanismo anti-herbivoria é mais econômico que a produção de toxinas (O'Dowd 1979). Ainda, a produção de NEF provém uma defesa mais efetiva em relação às toxinas, devido à dificuldade de uma espécie herbívora em desenvolver uma resistência específica contra formigas (McLain 1983).

Os NEF peciolares de *P. alata*, além de produzir néctar e estabelecer relações com formigas do gênero *Crematogaster*, apresentam morfologia semelhante aos ovos de borboletas do gênero *Heliconius*. Os insetos destas espécies ovipõem apenas em órgãos jovens da planta que não possuam ovos prévios (Benson 1978, Mugrabi-Oliveira &

Moreira 1996, Dell'Erba *et al.* 2005). Desta forma, a presença de estruturas mímicas previne a oviposição e, conseqüentemente, evita o consumo dos órgãos jovens pelas larvas destas borboletas.

Glândulas foliares em *Passiflora*

Passifloraceae é uma família reconhecida taxonomicamente pela presença de glândulas foliares, ausentes somente em alguns gêneros do subgênero *Decaloba* (Müschner *et al.* 2003, Ulmer & MacDougal 2004, Yockteng & Nadot 2004, Judd *et al.* 2009). Descrições taxonômicas de *P. alata* e *P. edulis* mencionam glândulas presentes nos órgãos vegetativos aéreos destas espécies; entretanto, um inventário e identificação das estruturas secretoras foliares presentes eram ainda inexistentes. O quadro 1 apresenta as descrições taxonômicas das glândulas foliares de ambas as espécies e as informações inéditas levantadas neste estudo.

Quadro 1. Comparação entre as estruturas descritas por Bernacci *et al.* (2003) e os resultados obtidos neste estudo (capítulos 1 e 2).

	descrições taxonômicas (Bernacci <i>et al.</i> 2003)	descrições inéditas
<i>P. alata</i>	glândulas peciolares estípulas falciformes, inteira a raramente denteada margem foliar inteira a denteada	as glândulas são NEF e <i>egg mimics</i> de borboletas Heliconiini os dentes glandulares são coléteres os dentes glandulares são NEF
<i>P. edulis</i>	nectários extraflorais peciolares lobos oval-elípticos, serreados e glandulares	as glândulas são corroboradas como NEF as glândulas são identificadas como NEF

A identificação das glândulas marginais e peciolares como **NEF** foi realizada a partir de duas técnicas realizadas em campo. (i) Inicialmente foi observado se o exsudato provia recursos à fauna associada, indicativo da natureza nectarífera destas glândulas; (ii) o teste com a glicofita foi realizado nos ramos isolados cujas glândulas apresentavam exsudato profuso, indicando a presença de glicose, açúcar comum e abundante nos NEF. A ocorrência da solução açucarada e a coleta por formigas foram suficientes para classificar as glândulas como NEF. Observações adicionais, como a presença de fungos sobre as glândulas, visualizados sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), são um indício da existência de açúcares no exsudato (Dias 2008). A presença de glicose e/ou frutose e sacarose foi posteriormente confirmada pela análise do néctar em espectrometria de massas (MS).

A observação de formigas de diferentes gêneros sobre um mesmo indivíduo, como espécies de *Crematogaster* e *Camponotus* observadas em *P. edulis*, foram registradas em *P. auriculata* (Apple & Feener 2001) e *P. incarnata* (McLain 1983). Estas formigas apresentam comportamento agressivo entre si e outros insetos (Bentley 1977, McLain 1983), e poderia justificar a presença de um gênero sobre os NEF marginais e de outro sob os peciolares, embora comportamentos de exclusão não tenham sido observados.

Os estudos químicos aliados às observações morfológicas fornecem indícios ou respostas de questões ecológicas; p. ex., a presença de fungos é restrita à fase pós-secretora dos NEF peciolares de ambas as espécies e à região não secretora dos NEF marginais interlobais em fase secretora de *P. edulis*. A presença de metabólitos secundários no néctar e a acidez do pré-néctar observada nos NEF laminares de *P. alata* inibem a presença destes microorganismos, que colonizam estas glândulas apenas nas regiões e/ou fases de desenvolvimento da glândula em que estes compostos não estão presentes.

A identificação de uma glândula como coléter requer observações de campo e estudos histológicos, pois a classificação desta estrutura é funcional (Fahn 1979, Thomas 1991). Devido ao eventual aspecto fluido – e não viscoso, como é normalmente observado nos coléteres de Apocynaceae – e a presença de polissacarídeos na secreção, evidenciados por meio dos testes histoquímicos aplicados, estas glândulas – como as presentes nas estípulas de *P. alata* – podem ser erroneamente identificadas como NEF. A correta categorização da glândula envolve observações em campo, para verificar se o exsudato, fluido ou viscoso, é produzido por estruturas secretoras ativas apenas em órgãos jovens, e procedimentos histoquímicos com reagentes específicos para mucilagem, como o ácido tânico/cloreto férrico e outros que identifiquem às diferentes classes de polissacarídeos que compõem a mucilagem. O conhecimento da massa molar dos açúcares presentes no sistema hidro-gel que constitui a mucilagem permite a identificação destes compostos no exsudato por meio da análise em MS, corroborando a natureza mucilagínosa da secreção.

A distensão da cutícula e o acúmulo do exsudato no espaço subcuticular é uma característica das glândulas em *Passiflora* e em diversas espécies de famílias de Malpighiales. Embora o rompimento da cutícula seja descrito por diversos autores como o mecanismo de liberação do exsudato para o ambiente, a cutícula rompida foi registrada apenas nos NEF peciolares de *P. edulis*, em que o comportamento agressivo das formigas foi observado durante a coleta do néctar. De acordo com estudos em andamento com glândulas do subgênero *Decaloba*, sugere-se a existência de microporos na cutícula por onde o exsudato é liberado (Krosnick, comunicação pessoal).

NEF peciolares e laminares de ambas as espécies apresentam padrão anatômico da região secretora semelhante, embora a morfologia externa destas estruturas seja diferenciada. Sobrepondo ilustrações de secções longitudinais medianas de NEF elevados

– semelhante aos peciolares de *P. alata* –, globulares e ocelolares presentes em diferentes espécies de famílias não relacionadas, Belin-Depoux (1989) observou que as zonas secretoras são semelhantes e sugeriu que as diferenças morfológicas devem-se ao tecido não secretor periférico, que prolifera nestas regiões promovendo a elevação desta porção da glândula; esta proliferação de tecido não secretor foi relacionada à proteção das zonas nectaríferas ativas. Em *P. alata*, o néctar está disponível para os coletores no ápice destas glândulas, inviabilizando o contato direto entre os coletores e o tecido nectarífero, evitando assim o eventual comportamento agressivo das formigas na coleta, como observado nos NEF peciolares de *P. edulis*; esta é uma evidência do papel protetor sugerido aos tecidos periféricos não secretores.

As margens das folhas e estípulas de *Passiflora* podem exibir diversos padrões – inteiras, serreadas, denteadas ou glandulares. Estudos moleculares realizados em espécies de *Passiflora* evidenciam que os genes envolvidos na produção da folha e suas glândulas são os mesmos envolvidos na produção de estípulas (Ulmer & MacDougal 2004). A ontogênese das glândulas foliares de *P. alata* e *P. edulis*, e em outras espécies de *Passiflora* descritas em literatura (Durkee 1982), permitiram definir estas glândulas como estruturas homólogas. A origem foliar destas glândulas corrobora as informações moleculares supramencionadas. Esta definição é fundamental para futuros estudos evolutivos envolvendo as glândulas foliares de espécies de Passifloraceae *sensu lato*.

As diferenças quanto à sincronia no desenvolvimento e dinâmica de secreção encontrada nos NEF foliares de ambas as espécies e coléteres em *P. alata* são dados inéditos e relevantes em estudos ecológicos. A assincronia no desenvolvimento dos NEF marginais e, conseqüentemente, na produção de néctar por um grande número de glândulas mantém o oferecimento de néctar por um longo período. O fato dos NEF marginais de *P. edulis* apresentarem desenvolvimento basípeto e finalizarem a fase

secretora quando esta é iniciada nas peciolares evidencia o *continuum* entre os NEF foliares nesta espécie. Desta forma, o oferecimento de néctar é constante nos órgãos jovens, preferencialmente escolhidos pelas fêmeas de borboletas Heliconiini para oviposição e consumidos pelas larvas provenientes destes ovos (Benson *et al.* 1975, Brown 1981, Spencer 1988).

Aparentemente, os NEF laminares são menos explorados por formigas em comparação aos peciolares de ambas as espécies. Espécies de *Populus* – Salicaceae – apresentam quatro diferentes estratégias morfológicas de defesa: (i) a presença de tricomas tectores na lâmina foliar; (ii) glândulas resiníferas nas margens foliares; (iii) NEF peciolares; (iv) e pecíolo comprimido lateralmente, promovendo o balanço das folhas com o vento e impedindo o pouso de insetos. No entanto, apenas a presença das glândulas resiníferas e dos NEF foliares oferece resultado efetivo contra os herbívoros; as outras alterações morfológicas são vestígios das diferentes estratégias adotadas ao longo do tempo evolutivo (Curtis & Lersten 1978). A baixa incidência de formigas sobre os NEF laminares de *P. edulis* e a ausência de visitas em *P. alata* contrasta com a grande quantidade de coletores registrados durante o período de observação sobre os NEF peciolares de ambas as espécies; sugere-se que estas glândulas são mais eficazes no recrutamento de formigas. Em experimentos realizados em *Passiflora auriculata*, os NEF peciolares foram removidos e a visitação pelas formigas diminuiu, em detrimento da funcionalidade dos NEF presentes na superfície da lâmina foliar, evidenciando uma predileção pelos NEF que apresentam néctar em maior volume (Apple & Feener 2001). Neste contexto, a baixa observação de formigas nos NEF marginais de ambas as espécies pode ser explicada por uma predileção destes invertebrados pelo maior volume aparente e/ou a diferença na composição do néctar oferecido pelos NEF peciolares.

Os NEF laminares estão ativos apenas nos órgãos jovens de *P. alata* e *P. edulis*; na literatura, este fenômeno é descrito em *P. incarnata* (McLain 1983) e *P. glandulosa* (Pascal 1993) e relaciona-se aos sítios preferenciais de oviposição por borboletas Heliconiini. Este intervalo de glândulas ativas restrito aos órgãos jovens ocorre também em *Turnera ulmifolia*; considerando-se a semelhança entre a distribuição geográfica e morfologia das glândulas desta espécie e *Passiflora*, sugere-se uma convergência adaptativa destas estruturas. As famílias Turneraceae e Passifloraceae, antes próximas nos sistemas de classificação (Judd *et al.* 2009), encontram-se, atualmente, circunscritas em uma mesma família, Passifloraceae *sensu lato* (APG III 2009). A ocorrência de estruturas secretoras ontogeneticamente semelhantes reforça a inserção de Turneraceae em Passifloraceae.

O presente estudo aborda os aspectos morfológicos e ecológicos envolvendo as estruturas secretoras presentes nos órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* e *P. edulis*, utilizando técnicas convencionais em anatomia e histoquímica acopladas às técnicas específicas, como a localização *in situ* de alcalóides e flavonóides e a adaptação da técnica *in vitro* para estimar a atividade antioxidante pelo uso do reagente DPPH. As metodologias de espectroscopia por energia dispersiva de raios-x e espectrometria de massas confirmam os resultados encontrados nos estudos anatômicos e histoquímicos. A relevância deste trabalho consiste na divulgação da importância da anatomia nas diferentes abordagens científicas da atualidade ao fornecer indícios e possibilitar responder várias questões que concernem às diferentes áreas supramencionadas.

PERSPECTIVAS

A partir deste estudo, surgiram algumas propostas de projetos futuros relacionados às glândulas foliares e aos compostos bioativos presentes nos órgãos vegetativos aéreos destas espécies, abordadas a seguir:

Estudos ecológicos e químicos dos nectários – a discussão do capítulo 1 evidencia a importância de estudos ecológicos que enfoquem os NEF destas espécies em ambientes naturais. Estudos em ecologia química podem elucidar o papel dos terpenos presentes nos idioblastos dispersos no parênquima nectarífero dos NEF peciolares de *P. alata*, e legitimar a morfologia estipitado-crateriforme desta glândula como contentora de voláteis. Estudos ecológicos relativos às relações tróficas envolvendo estas espécies são fortemente encorajados.

Estudos de reabsorção de néctar, inexistentes em NEF – experimentos e estudos que envolvam diferentes técnicas que evidenciem possíveis rotas apoplásticas de reabsorção de néctar podem contribuir com informações relevantes à descrição da fase pós-secretora destas glândulas e fornecer dados inéditos quanto a este fenômeno em NEF.

Análise ultra-estrutural dos NEF presentes nos pecíolos e lâmina foliares nas diversas fases de desenvolvimento – a partir destes dados, pode-se comparar aos obtidos por Durkee (1982, 1983b) e avançar o conhecimento quanto à dinâmica intracelular dos processos de secreção de néctar e de outros compostos eventualmente presentes. A presença de poros na cutícula, sugerida por Krosnick (comunicação pessoal)

deve ser confirmada para verificar se a cutícula rompida é resultante de injúrias provocadas pelos coletores ou artefato das técnicas.

Estudos moleculares e de localização intracelular das organelas envolvidas na biossíntese dos compostos bioativos presentes em *P. alata* e *P. edulis* – a partir de informações provenientes do capítulo 3, sugere-se a localização, através de estudos imunocitoquímicos e de hibridação *in situ* das organelas envolvidas na produção e translocação destes compostos. Desta forma, será possível aliar as rotas biossintéticas conhecidas às organelas envolvidas, fornecendo dados que auxiliem na elaboração de modelos que facilitem a compreensão da biossíntese destes compostos *in vivo*.

Experimentos com indivíduos de *P. alata* cultivados em diferentes tipos de solo para observação dos tipos de cristais formados e átomos que os constituem – existe uma relação direta entre a formação de cristais no parênquima nectarífero e a concentração de seus elementos constitutivos no solo? Para averiguar se os átomos de ferro da areia cristalífera são armazenados em *P. alata* devido à sua concentração no solo, sugere-se a elaboração de experimentos de cultivo de indivíduos desta espécie em diferentes tipos de solo suplementados com ferro – incluindo hidroponia – e a posterior observação da areia cristalífera em espectroscopia por energia dispersiva de raios-x.

Levantamento das glândulas foliares em mais espécies de Passifloraceae e em outras famílias relacionadas – o levantamento e identificação de glândulas foliares nas espécies de Passifloraceae *s.l.* cuja distribuição geográfica seja semelhante é encorajado para se legitimar a sugestão de convergência evolutiva deste caráter. O levantamento e identificação de estruturas miméticas são relevantes para futuros estudos ecológicos e

evolutivos envolvendo a relação entre espécies de *Passiflora* e borboletas Heliconiini. Incentiva-se o estudo de espécies de *Passiflora* que apresentam NEF ocelares, marginais e peciolares para que prováveis padrões evolutivos entre estas estruturas sejam estabelecidos.

Referências¹ (Introdução e Discussão gerais)

- ADDICOTT, J.F. 1984. Mutualistic interactions in population and community processes. *In A new ecology: novel approaches to interactive systems* (P.W. Price, C.N. Slobodchikoff & B.S. Gaud, eds.). John Wiley, New York, p.437-451.
- ADLER, L.S. 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91:409-420.
- ADLER, L.S. & IRWIN, R.E. 2005. Ecological costs and benefits of defenses in nectar. *Ecology* 86:2968-2978.
- AKHONDZADEH, S. & MALEKI, J. 2006. Herbal medicines in the treatment of psychiatric and neurological disorders. *Iran Journal of Psychiatry* 1:1-11.
- AMENT, K., KANT, M.R., SABELIS, M.W., HARING, M.A. & SCHURINK, R.C. 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology* 135:2025-2037.
- ANTOGNONI, F., ZHENG, S., PAGNUCCO, C., BARALDI, R., POLI, F. & BIONDI, S. 2007. Induction of flavonoid production by UV radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia* 78:345-352.
- APG III 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., VIEIRA, M.L.C. & DORNELAS, M.C. 1999. Anatomical studies of organogenesis induced in leaf-derived explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:2007-2013.
- APPLE, J.L. & FEENER, D.H.J. 2001. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. *Oecologia* 127:409-416.

¹ Apresentadas de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica.

- BAKER, H.G., OPLER, P.A. & BAKER, I. 1978. A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectaries. *Botanical Gazette* 139:322-332.
- BARP, E.A., SOARES, G.L.G., GOSMANN, G., MACHADO, A.M., VECCHI, E.A. & MOREIRA, G.R.P. 2006. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. *Brazilian Journal of Biology* 6:853-862.
- BELIN-DEPOUX, M. 1989. Des hydathodes aux nectaires foliaires chez les plantes tropicales. *Bulletin de la Société Botanique de France* 136:151-168.
- BELIN-DEPOUX, M. 1993. Importance des nectaires extra-floraux dans les interactions plantes-fourmis. *Acta Botanica Gallica* 140:183-205.
- BELSKY, A.J. 1993. Overcompensation by plants: herbivore optimization or red herring? *Evolutionary Ecology* 7:109-121.
- BENDINI, A., CERRATANI, L., PIZZOLANTE, L., TOSCHI, T.G., GUZZO, F., CEOLDO, S., MARCONI, A.M., ANDREETTA, F. & LEVI, M. 2006. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research and Technology* 223:102-109.
- BENNATI, E. 1971. Quantitative determination of harmine and harmaline in the extract of *Passiflora incarnata*. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 110:664-669.
- BENNATI, E. & FEDELI, E. 1968. Gas chromatography of fluid extract of *Passiflora incarnata*. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 107:716-720.
- BENSON, W.W. 1978. Resource partitioning in passion vine butterflies. *Evolution* 32:493-518.
- BENSON, W.B., BROWN, K.S. & GILBERT, L.E. 1975. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29:659-680.
- BENTLEY, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8:407-427.

- BERNACCI, L.C., VITTA, F.A. & BAKKER, Y.V. 2003. Passifloraceae. *In* Flora fanerogâmica do estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd & A.M. Giullietti, orgs.). RiMa/FAPESP, São Paulo, v. 3, p.252-256.
- BEZERRA, J.A.F., CAMPOS, A.C.L., VASCONCELOS, P.R.L., NICARETA, J.R., RIBEIRO, E.R., SEBASTIÃO, A.P.M., URDIALES, A.I.A., MOREIRA, M. & BORGES, A.M. 2006. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirurgica Brasileira* 3:16-25.
- BIRD, D.A., FRANCESCHI, R. & FACCHINI, P.J. 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in *Opium poppy*. *The Plant Cell* 15:2626-2635.
- BLÜTHGEN, N. & REIFENRATH, K. 2003. Extrafloral nectaries in an Australian rain forest: structure and distribution. *Australian Journal of Botany* 51:515-527.
- BLÜTHGEN, N., VERHAAGH, M., GOITIA, W., JAFFÉ, K., MORAWETZ, W. & BARTHLOTT, W. 2000. How plants shape the ant community in the Amazonia rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia* 125:229-240.
- BOUCHER, D.H., JAMES, S. & KEELER, K.H. 1982. The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:315-347.
- BROWN, K.S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 36:427-456.
- BUCKLEY, R.C. 1987. Interactions involving plants, homoptera and ants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:111-185.
- CASTRO, M. de M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3:1273-1284.
- CASTRO, P.C.F., HOSHINO, A., SILVA, J.C. & MENDES, F.R. 2007. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phytotherapy Research* 21:481-484.

- CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. 1997. Antifungal activity of *Solanum* fruit glycoalkaloids: implications for frugivory and seed dispersal. *Ecology* 78:799-809.
- COLEY, P.D., BRYANT, J.P. & CHAPIN, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230:895-899.
- COPELAND, L. & SLAYTOR, M. 1974. The excretion of β -carboline alkaloid harman in passionfruit. *Physiologia Plantarum* 31:327-329.
- COPP, N.H. & DAVENPORT, D.T. 1978. *Agraulis* and *Passiflora*. I. Control of specificity. *Biology Bulletin* 155:98-112.
- CRANE, J. 1955. Imaginal behaviour of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydra* Hewitson, with special reference to the social use of color. *Zoologica* 40:167–196.
- CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1978. Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* 65:1003-1010.
- DAVIES, K.M. & SCHWINN, K.E. 2006. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. *In* *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds.). CRC Press, Boca Raton, p.143-218.
- DELL'ERBA, R., KAMINSKI, L.A. & MOREIRA, G.R.P. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Série Zoologia* 95:29-46.
- DeLUCA, V. & CUTLER, A.J. 1987. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 85:1099-1102.
- DeLUCA, V. & ST-PIERRE, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science – Reviews* 5:1360-1385.

- DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae), SP, Brasil. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DENNO, R.F. & DONNELLY, M.A. 2008. Patterns of herbivory on *Passiflora* leaf tissues and species by generalized and specialized feeding insects. *Ecological Entomology* 6:11-16.
- DEUS-NEUMANN, B. & ZENK, M.H. 1984. A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* 162:250-260.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001a. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* L. *Journal of Ethnopharmacology* 78:165-170.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001b. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia* 72:922-926.
- DHAWAN, K., KUMAR, S. & SHARMA, A. 2001c. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* e *P. edulis*. *Fitoterapia* 72:698-702.
- DHAWAN, K., DHAWAN, S. & SHARMA, A. 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94:1-23.
- DIAS, A.C.A. 2008. Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala* L. (Polygalaceae) com ênfase nas estruturas secretoras. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DIAZ-CASTELAZO, C., RICO-GRAY, V., ORTEGA, F. & ANGELES, G. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of Coastal Veracruz, México. *Annals of Botany* 96:1175-1189.
- DIXON, R.A. & PAIVA, N.L. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.

- DORNELAS, M.C., FONSECA, T.C. & RODRIGUEZ, A.P.M. 2006. Brazilian passionflowers and novel passionate tropical flowering gems. floriculture, ornamental and plant biotechnology. Global Science Books, United Kingdom.
- DUKE, M.V., PAUL, R.N., ELSOHLY, H.N., STURTZ, G. & DUKE, S.O. 1994. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissue of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. International Journal of Plant Science 155:365-372.
- DURKEE, L.T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. American Journal of Botany 69:1420-1428.
- DURKEE, L.T. 1983a. Protein-containing cells in the nectary phloem of *Passiflora warmingii*. American Journal of Botany 70:1011-1018.
- DURKEE, L.T. 1983b. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. In The biology of nectaries (B. Bentley & T. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.1-29.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). American Journal of Botany 71:596-602.
- DURKEE, L.T., GAAL, D.J. & REISENER, W.T. 1981. The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. American Journal of Botany 68:453-462.
- DUSSOURD, D.E. & DENNO, R.F. 1991. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. Ecology 72:1383-1396.
- EHMKE, A., BORSTEL, K. & HARTMANN, T. 1988. Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. Planta 176:83-90.
- EHRlich, P.R. & RAVEN, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18:586-608.
- ELIAS, T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In The biology of nectaries (B. Bentley & T.S. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p.174-182.

- EVERT, R.F. 2006. Esau's plant anatomy: meristems, cells and tissues of plant body: their structure, function and development. John Wiley & Sons, New Jersey, p.176.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues and factors influencing their development. *Phyton* 28:13-26.
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31:37-75.
- FARINAZZO, N.M. & SALIMENA, F.R.G. 2007. Passifloraceae da Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, MG, Brasil. *Rodriguésia* 58:823-833.
- FARMACOPÉIA ALEMÃ 1992. Deutsches Arzneibuch. Ausgabe Govi, Stuttgart.
- FARMACOPÉIA AMERICANA 2000. The United States Pharmacopeia. USP24 Rockville, United States.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1977. Farmacopéia Brasileira. Organização Andrei, São Paulo.
- FARMACOPÉIA EUROPÉIA 1996. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasburg. <http://www.online6.edqm.eu/ep600> (acesso em 12/12/2009).
- FARMACOPÉIA HELVÉTICA 1987. Pharmacopoeia Helvética, 7 ed. Eidgenössische, Bern. <http://www.rt-corp-com/products/c306.aspx> (acesso em 12/12/2009).
- FARMACOPÉIA ITALIANA 1988. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Libreria dello Stato, Roma.
- FERNANDO, A.J., VIEIRA, M.L.C., MACHADO, S.R. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2007. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91:37-44.
- FOWLER, M.W. 1981. Plant cell biotechnology to produce desirable substances. *Chemistry and Industry* 4:229-233.

- FRAENCKEL, G.S. 1959. The *raison d'être* of secondary plant substances. *Science* 129:1466-1470.
- FRANCESCHI, V.R., KREKLING, T., BERRYMAN, A.A. & CHRISTIANSEN, E. 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reaction. *American Journal of Botany* 85:601-615.
- FREITAS, P.C.D. 1985. Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero *Passiflora* L. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GALETTO, L. & BERNADELLO, L. 1992. Nectar secretion pattern and removal effects in six argentinean Pitcaimioideae (Bromeliaceae). *Botanica Acta* 105:292-299.
- GARCÍA, M.T.A., GALATI, B.G. & HOC, O.S. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp (Passifloraceae). *Flora* 202:302-315.
- GILBERT, L.E. 1971. Butterfly plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with Heliconiini butterflies? *Science* 172:585-586.
- GILBERT, L.E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. *In* *Coevolution of animals and plants* (L.E. Gilbert & P.R. Raven, eds.). University of Texas Press, Texas, p.210-240.
- GOULD, K.S. & LISTER, C. 2006. Flavonoid function in plants. *In* *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, p.397-441.
- GRAEFF, F.G.N. & GUIMARÃES, F.S. 1999. Fundamentos de psicofarmacologia. Editora Atheneu, São Paulo.
- HARTMANN, T. & DIERICH, B. 1998. Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* 206:443-451.

- HARTMANN, T. & WITTE, L. 1995. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. *In* Alkaloids: chemical and biological perspectives (S.W. Pelletier, ed.). Elsevier Science Ltd, Athens, p.155-233.
- HEIL, M., FIALA, B., BAUMANN, B. & LINSENMAIR, K.E. 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectaries secretion by *Macaranga tanarin*. *Functional Ecology* 14:749-757.
- HEIL, M. & McKEY, D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology Systems* 34:425-453.
- IWASHINA, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113:287-299.
- JANZEN, D.H. 1968. Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. *Behavior* 32:33-48.
- JÁUREGUI, D., GARCÍA, M. & PEREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. *Caldasia* 24:33-40.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.J., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Artmed, Porto Alegre.
- KARAGEORGOU, P., BUSCHMANN, C. & MANETAS, Y. 2008. Red leaf color as a warning signal against insect herbivory: honest or mimetic? *Flora* 203:648-652.
- KARBAN, R. & BALDWIN, I.T. 1997. *Induced responses to herbivory*. The University of Chicago Press, Chicago.
- KELLY, C.A. 1986. Extrafloral nectarines: ants, herbivores and fecundity in *Cassia fasciculata*. *Oecologia* 69:600-605.
- KENOYER, L.A. 1917. Environmental influences on nectar secretion. *Botanical Gazette* 63:249-265.

- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History 19:1-613.
- KNOX, R.B., KENRICK, J., BERNHARDT, P., MARGINSON, R., BERESFORD, G., BAKER, I. & BAKER, H.G. 1985. Extrafloral nectaries as adaptations for bird pollination in *Acacia terminalis*. American Journal of Botany 72:1185-1196.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In Insect-plant interactions (E. Bernays, ed.). CRC Press, Boca Raton, p.81-129.
- KURTZ, S.M.T.F., SANTOS, C.A.M., DUARTE, M.R. & SATO, M.E.O. 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. Acta Farmaceutica Bonaerense 22:102-112.
- KUTCHAN, T.M. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 8:292-300.
- LABEYRIE, E., PASCAL, L., DELABIE, J., ORIVEL, A., DEJEAN, A. & HOSSAERT-McKEY, M. 2001. Protection of *Passiflora glandulosa* (Passifloraceae) against herbivory: impact of ants exploiting extrafloral nectarines. Sociobiology 38:317-321.
- LEAL, I.R., FISCHER, K., CHRISTIAN, M., TABARELLI, K. & WIRTH, R. 2006. Ant protection against herbivores and nectar thieves in *Passiflora coccinea* flowers. Ecoscience 13:431-438.
- LI, Q.M., HEUVEL, H.V.D., LORENZO, O., CORTHOUT, J., PIETERS, L.A., VLIETINCK, A.J. & CLAYES, M. 1991. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from *Passiflora incarnata*. Journal of Chromatography 562:435-446.
- LINDSEY, K. & YEOMAN, M.M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. Journal of Experimental Botany 34:1055-1065.

- LOMBARDI, S.P., PASSOS, I.R., NOGUEIRA, M.C.S. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2007. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* MSt. Brazilian Archives of Biology and Technology 50:239-247.
- LUTOMSKI, J. 1959. Qualitative and quantitative chromatographic investigations of alkaloids of *Passiflora incarnata*. Bulletin of the Institute Rose Lectures 5:181-198.
- LUTOMSKI, J. 1967. Simple alkaloids. I. Thin-layer chromatography of harman alkaloids occurring in plant material and in preparation. Herba Polland 13:44-52.
- LUTOMSKI, J. ADAMSKA, M. & JARUELSKI, M. 1968. Simple carboline alkaloids. V. Comparative analysis of the basic components of *Passiflora incarnata* grown in greenhouses and open fields. Herba Polland 13:139-147.
- LUTOMSKI, J. & MALEK, B. 1975. Pharmacochemical investigations on raw materials genus *Passiflora*. 3. Phytochemical investigations on the raw materials of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Planta Medica 27:222-225.
- LUTOMSKI, J. MALEK, B. & STACHOWIAK, Z. 1974. Pharmacochemical investigations of the raw materials from *Passiflora* genus. 1. New method of chromatographic separation and fluorometric-planimetric determination of alkaloids and flavonoids in Harman raw materials. Planta Medica 26:311-317.
- LUTOMSKI, J. MALEK, B. & RYBACKA, L. 1975. Pharmacochemical investigations of the raw materials from *Passiflora* genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Planta Medica 27:111-121.
- LUTOMSKI, J. & WROCINSKI, T. 1960. Pharmacodynamic properties of *Passiflora incarnata* preparations. The effect of alkaloids and flavonoids components on pharmacodynamic properties of the raw materials. Bulletin of the Institute Rose Lectures 6:176-184.
- MACHADO, S.R. 2002. Nectários extraflorais ou glândulas de óleo? In Avanços em Biologia Celular (M.E. Bauer & E.A. Jeckel-Neto, eds). Editora PUCRS, Porto Alegre, p.177-180.

- MAHROUG, S., COURDAVAULT, V., THIERSAULT, M., ST-PIERRE, B. & BURLAT, V. 2006. Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta* 223:1191-1200.
- MAKKAR, H.P.S., SIDDHURJU, P. & BECKER, K.U. 2007. Plant secondary metabolites. Humana Press, New Jersey.
- MARINOVA, K., KLEINSCHMIDT, K., WEISSENBOÖCH, G. & KLEIN, M. 2007. Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* 144:432-444.
- McLAIN, K. 1983. Ants, extrafloral nectaries and herbivory on the passion vine, *Passiflora incarnata*. *The American Midland Naturalist* 110:433-439.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press, Oxford.
- MORAES, M.L.L. 1995. Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora incarnata* L. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de São Carlos, São Carlos.
- MUGRABI-OLIVEIRA, E. & MOREIRA, G.R.O. 1996. Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13:929-937.
- MÜSCHNER, V.C., LORENZ, A., CERVI, A.C., BONATTO, S.L., SOUZA-CHIES, T.T., SALZANO, F.M. & LORETA, B.F. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 90:1229-1238.
- NICOLSON, S.W., NEPI, M. & PACINI, E. 2007. Nectaries and nectar. Springer-Verlag, The Netherlands.

- O'DOWD, D.J. 1979. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia* 43:233-248.
- O'DOWD, D.J. & CATCHPOLE, E.A. 1983. Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. ant interactions. *Oecologia* 59:191-200.
- OGA, S., FREITAS, P.C., SILVA, A.C.G. & HANADA, S. 1984. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica* 50:303-306.
- OLIVA, P.B., MENEZES, H.C. & FERREIRA, V.L.P. 1996. Estudo da estabilidade do néctar de acerola. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 16:223-228.
- OTANI, M., SHITAN, N., SAKAI, K., MARTINOIA, E., SATO, F. & YAZAKI, K. 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138:1939-1946.
- OTOBONE, F.J., MARTINS, J.V.C., TROMBELLI, M.A., ANDREATINI, R. & AUDI, E.A. 2005. Anxiolytic and sedative effects of a combined extract of *Passiflora alata* Dryander and *Valeriana officinalis* L. in rats. *Acta Science of Health Sciences* 27:145-150.
- PASCAL, L. 1993. Production and composition of extrafloral nectaries of two lianas from French-Guiana, *Stigmaphyllon convolvulifolium* and *Passiflora glandulosa* – comparison with the primary metabolites from phloem sap. *Acta Botanica Gallica* 140:117-131.
- PEMBERTON, R.W. & LEE, J.H. 1996. The influence of extrafloral nectaries on parasitism of an insect herbivore. *American Journal of Botany* 83:1187-1194.
- PEREIRA, C.A.M. & VILEGAS, J.H.Y. 2000. Constituintes químicos e farmacologia de *P. alata* Curtis, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora incarnata* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3:1-12.
- PETRY, R.D., REGINATTO, F., PARIS, F., GOSMANN, G., SALGUEIRO, J.B., QUEVEDO, J., KAPCZINSKI, F., ORTEGA, G.G. & SCHENKEL, E.P. 2001. Comparative pharmacological

- study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *P. edulis* leaves. *Phytotherapy Research* 15:162-164.
- POZUELO, J.M., LUCAS, M.M., LORENZO, L.C., FERNANDEZ-PASCOAL, L., MALDONADO, S. & FELIPE, M.R. 2001. Immunolocalization of alkaloids and X-ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma* 218:104-111.
- PRICE, P.W., BOUTON, C.E., GROSS, P., McPHERON, B.A., THOMPSON, J.N. & WEIS, A.E. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:41-65.
- PROLIAC, A. & RAYNAUD, J. 1988. O-glycosyl-2"-C-glycosyl-6-apigenine of *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae). *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 63:174-175.
- RHAMAN, K., KRENN, L., KOOP, B., SCHUBERT-ZSILAVECZ, M., MAYER, K.K. & KUBELKA, W. 1997. Isoscoparin-2"-O-glucoside from *Passiflora incarnata*. *Phytochemistry* 45:1093-1094.
- RICO-GRAY, V., OLIVEIRA, P.S., PARZA-TABLA, V., CUAUTLE, M. & DÍAZ-CASTELAZO, C. 2004. Ant-plant interactions: their seasonal variations and effects on plant fitness. *In* Coastal Dunes: ecology and conservation (M.L. Martínez & N.P. Psuty, eds). Springer-Verlag, Berlin, p.221-239.
- ROTH, I. 1969. Desarrollo de los nectarios extra-florales em *Passiflora foetida*. *Acta Botanica Venezuelica* 6:44-49.
- ROTH, I. 1974. Morfología, anatomía y desarrollo de la hoja pinnada y de las glándulas laminares em *Passiflora* (Passifloraceae). *Acta Botanica Venezuelica* 9:363-380.
- RUDGERS, J.A. & GARDENER, M.C. 2004. Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. *Ecology* 85:1495-1502.

- SCHMID, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries - historical perspectives and terminological recommendations. *The Botanical Review* 54:179-227.
- SCHOONHOVEN, L.M. & van LOON, J.J.A. 1998. Ecology: living apart together. *In* *Insect-plant biology: from physiology to evolution* (L.M. Schoonhoven & J.J.A. van Loon, eds.). Chapman & Hall, London, p.189-259.
- SMILEY, J. 1978. Plant chemistry and the evolution of host specificity: new evidence from *Heliconius* and *Passiflora*. *Science* 201:745-747.
- SMILEY, J. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on caterpillar survivor. *Ecology* 67:516-521.
- SMITH, L.L., LANZA, J. & SMITH, G.C. 1990. Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. *Ecology* 71:107-115.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Clarendon Press, Oxford.
- SPENCER, K.C. 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. *In* *Chemical mediation of coevolution* (K.C. Spencer, ed.). Academic Press Inc., San Diego, p.168-175.
- STEPHENSON, A.G. 1982. Iridoid glycosides in the nectar of *Catalpa speciosa* are unpalatable to nectar thieves. *Journal of Chemical Ecology* 8:1025-1034.
- ST-PIERRE, B., VAZQUEZ-FLOTA, F.A. & DeLUCA, V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *The Plant Cell* 11:887-900.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2009. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre.
- THALER, J.S. 1999. Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686-688.

- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- TREUTTER, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4:147-157.
- TRIGO, J.R. 2000. The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. *Journal of Brazilian Chemical Society* 11:551-561.
- ULMER, T. & MacDOUGAL, J.M. 2004. *Passiflora: passionflowers of the world*. Timber Press, Cambridge.
- VERPOORTE, R. & SCHRIPSEMA, J. 1994. Isolation, identification, and structure elucidation of alkaloids: a general review. *In* Modern methods of plant analysis (H.F. Linskens & J.F. Jackson, eds). Springer-Verlag, Amsterdam, p.1-22.
- WÄCKERS, E.L., ZUBER, D., WUNDERLIN, R. & KELLER, F. 2001. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany* 87:365-370.
- WAGNER, D. & KAY, A. 2002. Do extrafloral nectaries distract ants from visiting flower? An experimental test of an overlooked hypothesis. *Evolutionary Ecology Research* 4:293-305.
- WALDHAUSER, S.S.M. & BAUMANN, T.W. 1996. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry* 42:985-996.
- WEID, M., ZIEGLER, J. & KUTCHAN, T.M. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:13957-13962.

- WEINSSENBOCK, G. & SACHS, G. 1977. On the localization of enzymes related to flavonoid metabolism in sections and tissues of oat primary leaves. *Planta* 137:49-52.
- WILLIAMS, D.H., STONE, M.J., HAUCK, P.R. & PAHMAN, S.K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products* 52:1189-1208.
- WILLIAMS, K.S. & GILBERT, L.E. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science* 212:467-469.
- WIRTH, R. & LEAL, I.R. 2001. Does rainfall affect temporal variability of ant protection in *Passiflora coccinea*? *Ecoscience* 8:450-453.
- WOLLENWEBER, E. & DÖRR, M. 2008. Flavonoid aglycones from the lipophilic exsudates of some species of Rosaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 36:481-483.
- YOCKTENG, R. & NADOT, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:379-396.
- YUDASHEVA, L.N., CARVALHO, E.B., CASTANHO, M.T.J.A. & KRASILNIKOV, O.V. 2005. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:1061-1070.
- ZAMSKI, E., YAMAMOTO, Y.T., WILLIAMSON, J.D., CONKLING, M.A. & PHARR, D.M. 1996. Immunolocalization of mannitol dehydrogenase in celery plants and cells. *Plant Physiology* 112:931-938.
- ZIMMERMANN, J. 1932. Über die extrafloralen nektarien der Angiospermen. Beihefte zum Botanischen Centralblatt 49:99–196.
- ZUANAZZI, J.A.S. & MONTANHA, J.A. 2001. Flavonóides. *In* Farmacognosia: da planta ao medicamento (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, eds.). UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p.577-614.



Ata da Sessão pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em BIOLOGIA VEGETAL, a que se submeteu a aluna POLIANA RAMOS CARDOSO – RA-035285, orientada pela Profa. Dra. MARILIA DE MORAES CASTRO.

Aos vinte e um dias do mês de junho do ano de dois mil e dez, às 9 horas, na Sala de Defesa de Tese da Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Senhor Diretor do Instituto de Biologia, composta pelos Professores Doutores: MARILIA DE MORAES CASTRO (Presidente e Orientador), Professor Associado do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP; ADRIANA HISSAE HAYASHI, Pesquisador do Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica de São Paulo, SP e LUIZA SUMIKO KINOSHITA, Professor Titular do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, para analisar o trabalho da candidata POLIANA RAMOS CARDOSO, apresentado sob o título "ESTRUTURAS SECRETORAS EM ÓRGÃOS VEGETATIVOS AÉREOS DE *Passiflora alata* Curtis E *P. edulis* Sims (PASSIFORACEAE) COM ÊNFASE NA LOCALIZAÇÃO IN SITU DE COMPOSTOS BIOATIVOS". A Presidente declarou abertos os trabalhos, a seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi argüida pela Comissão Julgadora. Terminada a exposição e a arguição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADA **APROVADA CONDICIONALMENTE** ao atendimento das alterações sugeridas pela Comissão Julgadora especificadas no parecer anexo).

REPROVADA (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora).

Para fazer jus ao título de Mestre em Biologia Vegetal a versão final da dissertação, considerada Aprovada ou Aprovada Condicionalmente devidamente conferida pela CPG da Unidade, deverá ser entregue à CPG dentro do prazo de 60 dias, a partir da data da defesa. De acordo com o previsto na Deliberação CONSU-A8/08, Artigo 35, parágrafo 1º, inciso II e parágrafo 2º, a aluna Aprovada Condicionalmente que não atender a esse prazo será considerada Reprovada. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP, conferindo título de validade nacional aos aprovados.

Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente declara a sessão encerrada, sendo a ata lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pela Coordenadora da Comissão do Programa de Pós-Graduação, com ciência da aluna.


Prof. Dra. MARILIA DE MORAES CASTRO
Presidente da Comissão Julgadora


Dra. ADRIANA HISSAE HAYASHI


Prof. Dra. LUIZA SUMIKO KINOSHITA

Prof. Dra. ELIANA REGINA FORNI MARTINS
Coordenadora da CPPG-Biologia Vegetal

Maria Roseli de Melo
Secretaria de Pós-graduação

Ciência da aluna: 