

ESTUDO ANATÔMICO FOLIAR DE ESPÉCIES DE *Citrus* COM POTENCIAL MEDICINAL

Daiane Maia de Oliveira¹, Ivone Vieira da Silva²; Ana Aparecida Bandini Rossi²;

¹Mestranda Profissional em Biotecnologia da Universidade Estadual de Montes Claros (daypiano@hotmail.com)

²Professora Doutora da Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias da Universidade do Estado de Mato Grosso, caixa postal 324, Alta Floresta, Brasil

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

A família Rutaceae possui espécies consideradas medicinais, incluindo as frutas conhecidas por cítricas como a laranja, limão, toranja, lima, tangerina. Este trabalho teve como objetivo comparar características anatômicas foliares de *Citrus aurantium*, *Citrus limon* e *Citrus aurantifolia* coletadas no perímetro rural do município de Alta Floresta/MT. Para o estudo anatômico e histoquímico, secções transversais e paradérmicas da porção mediana da lâmina foliar foram obtidas a mão livre e, submetidas ao processo de dupla coloração com azul de astra e fucsina básica, lugol, sudan IV e floroglucinol. As espécies *C. aurantium* e *C. aurantifolia* apresentam folhas hipoestomáticas e *C. limon* anfiestomática. Todas as espécies estudadas apresentaram maior índice estomático na face foliar abaxial. Sendo esse índice 15,12 para *C. aurantium*; 14,32 em *C. limon*; e 14,74 para *C. aurantifolia*. Próximo às células epidérmicas da face adaxial ocorrem espaços secretores. O mesófilo das espécies estudadas é dorsiventral. Os testes histoquímicos nos espaços secretores foliares apresentaram resultado positivo para Sudan IV, evidenciou gotículas lipídicas e, também lugol que evidenciou grãos de amido para *C. aurantium*. O pecíolo apresentou células epidérmicas com cutícula espessa, córtex formado por células parenquimáticas e sistema vascular central e anelar. A análise histoquímica indicou a presença de gotículas lipídicas em *C. aurantium* e *C. aurantifolia*. Foram encontradas diferenças entre as espécies estudadas na distribuição dos estômatos, presença de sílica nas células epidérmicas, na disposição da hipoderme, no tipo de espessamento da parede secundária do elemento de vaso e células secretoras. É importante salientar a presença de canais secretores e células secretoras tanto na lâmina foliar quanto no pecíolo, compostos principalmente por gotas lipídicas.

PALAVRAS-CHAVE: Anatomia, Folha, Rutaceae, Planta medicinal.

ANATOMICAL STUDY OF SPECIES OF *Citrus* WITH POTENTIAL MEDICINAL

ABSTRACT

The family Rutaceae has considered medicinal species, including citrus fruit known to like orange, lemon, grapefruit, lime, tangerine. This study aimed to compare foliar anatomical characteristics of *Citrus aurantium*, *Citrus limon* and *Citrus aurantifolia* collected in a rural area of the municipality of Alta Floresta / MT. For histochemical and anatomical study, cross sections and paradermic the middle portion of the leaf blade were obtained free hand and subjected to double staining with astra blue and

basic fuchsin, lugol , sudan IV blue and phloroglucinol process. The species *C. aurantium* and *C. aurantifolia* exhibit hypostomatic leaves and *C. limon* amphistomatic. All species studied showed higher stomatal index in abaxial leaf face. Since this index to 15.12 *C. aurantium*; 14.32 *C. limon* and 14.74 for *C. aurantifolia*. Next to the adaxial epidermal cells secreting spaces occur. The mesophyll of the species studied is heterogeneous. The histochemical tests in foliar secretory spaces were positive for Sudan IV, showed lipid droplets and lugol showed that starch grains for *C. aurantium*. The petiole showed epidermal cells with thick cuticle, cortex composed of parenchyma cells, vascular system, and central ring. Histochemical analysis indicated the presence of lipid droplets in *C. aurantium* and *C. aurantifolia*. Differences were found among species in the distribution of stomata, presence of silica in epidermal cells, in the disposition of the hypodermis, the type of wall thickening of the vessel element and secretory cells. Importantly, the presence of secretory ducts and secretory cells in both the leaf blade as the stem, composed primarily of lipid droplets.

KEYWORDS: Anatomy, Leaf, Medicinal plant, Rutaceae.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é evidenciado ao longo da história desde os primórdios. Existe um grande número de plantas medicinais distribuídas mundialmente e são utilizadas pela medicina atual (fitoterápica) em diversos países, incluindo o Brasil (FERREIRA et al., 2011). Esse uso aumentou significativamente nos últimos anos (MILLANI, 2010). Entretanto, a planta "*in natura*" ou pré-processada utilizada pela população sem recomendação médica, é uma prática denominada medicina popular e, oferece riscos, como por exemplo, a dificuldade em se estabelecer dose, posologia e, em alguns casos, a verdadeira identidade de algumas espécies (PINHEIRO, 2001).

A família Rutaceae possui espécies consideradas medicinais. Inclui cerca de 150 gêneros e 1500 espécies, com distribuição cosmopolita, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais (CRONQUIST, 1988). No Brasil foram encontrados 32 gêneros nativos de Rutaceae com 154 espécies (PIRANI, 1999). Possuem representantes, desde árvores, arbusto até lianas (raro) e, frequentemente contém espinhos (CRONQUIST, 1981).

O *Citrus* é um gênero da família Rutaceae pertencente à ordem Sapindales, oriundas do sudeste tropical e subtropical da Ásia. O grupo é conhecido por conter três espécies e numerosos híbridos naturais e cultivados, incluindo as frutas conhecidas por cítricas como a laranja, limão, toranja, lima, tangerina, bergamota e a cidra (COSTA, 2010).

PRIDGEON (1982) afirmou que os caracteres úteis de maior importância taxonômica estão associados com a comparação anatômica foliar. Trabalhos morfoanatômicos têm sido desenvolvidos não só com folhas, mas também com caules, raízes, frutos, sementes e flores, envolvendo diversas famílias. Segundo GOMES et al. (2005) os estudos anatômicos assumem maior importância quando associados aos aspectos ecológicos, fisiológicos e taxonômicos.

Com o objetivo de fornecer informações bases sobre o gênero, o presente estudo comparou e descreveu os caracteres anatômicos foliar de *Citrus aurantium* L., *Citrus limon* L. Burm. F. e *Citrus aurantifolia* Swingl, coletados no município de Alta Floresta – MT.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O trabalho foi realizado com espécimes cultivadas na “Fazenda Sonho-Meu”, que possui uma área de 1.420 hectares, cujo acesso se dá pela rodovia MT 208 entre as coordenadas geográficas de 56°25' 00,9" W e 09°54' 53,01" S, perímetro rural do município de Alta Floresta/MT. O município possui uma área de 9.310,27 km², localizando-se no extremo Norte do estado de Mato Grosso a 830 km (oitocentos e trinta quilômetros) da capital Cuiabá, entre as coordenadas geográficas 56°14' 38" W e 09°54' 53,02" S. O trabalho foi conduzido no Laboratório Biologia Vegetal da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT.

Material Botânico

Foram coletadas folhas totalmente expandidas de três espécies de *Citrus*. *Citrus aurantium* conhecido popularmente como *Laranja*, *Citrus limon* conhecido como *limão* e *Citrus aurantifolia*, lima.

Procedimentos Metodológicos

Para o estudo anatômico utilizou-se amostra foliar. Parte do material coletado (lâmina foliar e pecíolo) foi processada a fresco e outras partes foram fixadas em FAA₅₀ (Formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%; 5:5: 90 v/v), por 48 horas e estocado em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Secções transversais e longitudinais foram obtidas à mão livre da região mediana da folha, com o auxílio de lâmina de barbear, coradas com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1962). Em seguida foram montadas em lâminas histológicas semipermanentes com gelatina glicerina (KAISER 1880).

A dissociação epidérmica seguiu o método de KRAUS e ARDUIN (1997) modificado, no qual as porções foliares foram colocadas em tubos de ensaio com água oxigenada (30 volumes) e ácido acético glacial na proporção de 1:1 e mantidas em estufa a 60 °C, por cerca de 48 horas. Após este período, as amostras foram lavadas em água destilada e em etanol 50 %, separando-se as duas superfícies epidérmicas, que foram coradas com azul de astra e fucsina básica, de acordo com recomendações de ROESER (1962) e montadas em gelatina glicerina.

Para a determinação do índice estomático foram feitos cortes paradérmicos na superfície adaxial e abaxial da folha. Os cortes foram observados em microscópio óptico de ocular e objetiva com 10 e 40 vezes de aumento, respectivamente, com isso possibilitou um aumento de 400 vezes. Em seguida, foram contadas as células estomáticas e totais da epiderme em 10 campos aleatórios. O índice estomático foi calculado de acordo com a fórmula de CUTTER (1986): índice estomático (IE) = $[NE/(CE + NE)] \times 100$, em que NE é o número de estômatos e CE o número de células epidérmicas propriamente ditas.

Algumas secções do material fresco foram utilizadas para os testes histoquímicos, nestes foram utilizados reagentes como o Lugol para identificar amido, Sudam IV para as gotículas lipídicas, solução de floroglucina em meio ácido, azul de astra para a celulose, por meio de recomendações de JOHANSEN (1940) e, a fucsina básica para a lignina (JENSEN 1962).

As fotomicrografias foram obtidas por meio do capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio Leica DMLB, com o auxílio do *software* Leica IM50.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as espécies estudadas a epiderme é uniestratificada, o mesofilo é dorsiventral e os feixes vasculares são colaterais (Fig. 1-9).

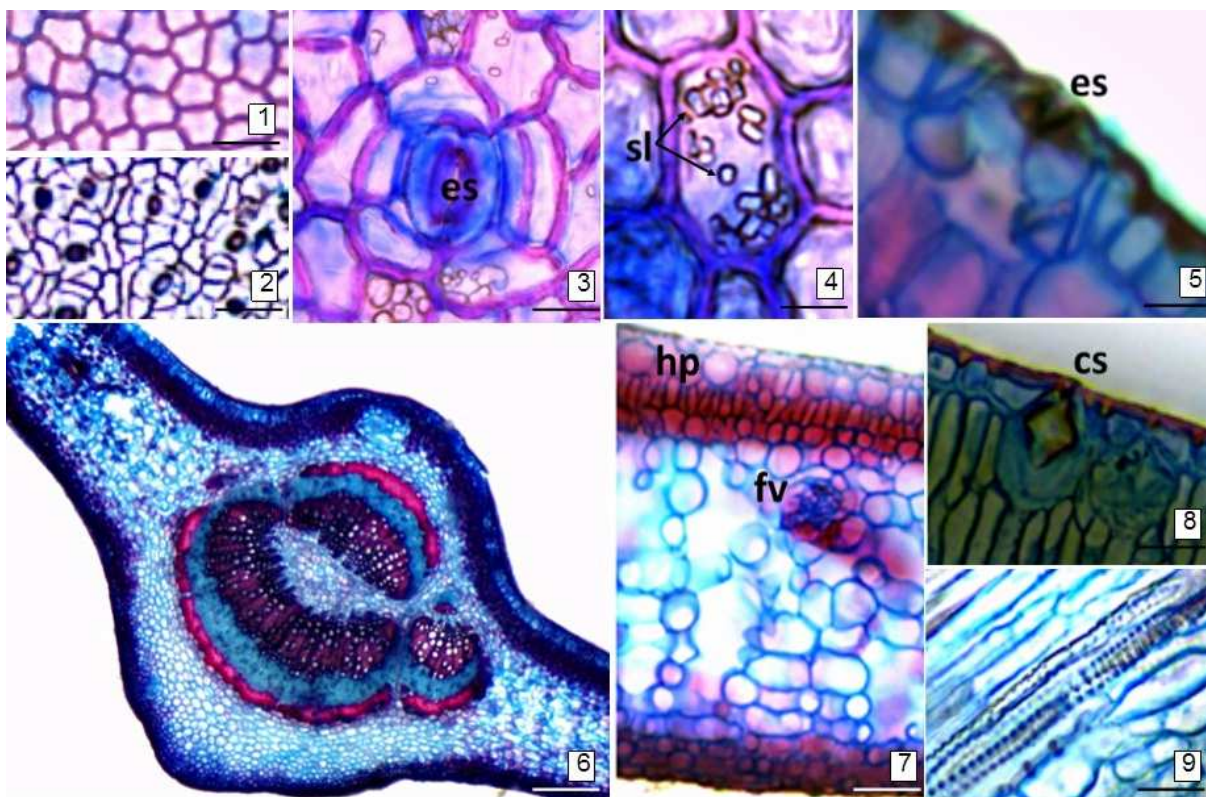


FIGURA 1-Vista frontal da epiderme adaxial de *C. aurantium*; **Figura 2**-Vista frontal da epiderme abaxial de *C. aurantium*; **Figura 3**-Detalhe de células epidérmicas adaxiais, contendo sílica em *C. aurantium*; **Figura 4**-Detalhe do estômato de *C. aurantium*; **Figura 5**-Secção transversal evidenciando estômato na face adaxial de *C. limon*; **Figura 6**-Aspecto geral da nervura central da folha de *C. aurantifolia*; **Figura 7**-Aspecto geral do mesofilo foliar de *C. limon*; **Figura 8**-Detalhe de Célula secretora em *C. aurantium*; **Figura 9**-Detalhe dos elementos de vasos escalariformes de *C. aurantium*. *sl*= sílica; *es*= estômato; *fv*= feixe vascular; *hp*= hipoderme, *cs*= célula secretora. Barras = 50 μm (1); 80 μm (2); 35 μm (3); 30 μm (4,5,8); 100 μm (6); 75 μm (7); 60 μm (9).

Nas três espécies estudadas, a epiderme foliar, em vista frontal, em ambas as faces apresentam células de paredes anticlinais retas a levemente onduladas (Fig. 1), sendo este caráter mais acentuado na face abaxial (Fig. 2). De acordo FAHN (1974) em algumas folhas e pétalas, as paredes periclinais externas, das células epidérmicas têm a função de concentrar a luz nas plantas que crescem à sombra.

Estudos mostram a correlação das células epidérmicas com a filotaxia de espécies da família Rutaceae. As folhas simples geralmente vão apresentar células epidérmicas de paredes retas em vista frontal e paredes onduladas em folhas compostas (SPEGAZZINI et al., 2002), o que corrobora com os resultados encontrados nesse estudo.

As três espécies estudadas apresentaram células epidérmicas pequenas, uniestratificada em ambas as faces com paredes espessas e lignificadas e cutícula lisa e delgada (Fig. 5, 7, 8), corroborando dados da família Rutaceae (GALLARDO & JIMÉNEZ, 2002).

Abaixo da nervura central a cutícula é mais espessa e em forma de U nas espécies estudadas. METCALFE & CHALK (1950) afirmaram que a ornamentação da cutícula é um importante caractere diagnóstico para separar espécies. SPEGAZZINI (2002) observou essa característica nas espécies de Rutaceae. No presente estudo, assim como para MUNTOREANU (2008), este caractere não parece ser informativo na delimitação das espécies.

As folhas são hipoestomáticas em *C. aurantium* e *C. aurantifolia* e anfiestomática em *C. limon* (Fig. 5) que apresenta predominância de estômatos na face abaxial. Corroborando METCALFE & CHALK (1950), os quais afirmaram que os estômatos, em Rutaceae, geralmente estão situados na face abaxial na maioria das espécies. Nas três espécies estudadas os estômatos são anomocíticos e se distribuem aleatoriamente pela epiderme com câmara subestomática pouco desenvolvida (Fig. 2, 5) assim como ocorre em vários membros do gênero *Zanthoxylum* (OGUNDIPE, 2002). As células-guarda das espécies estudadas se posicionam acima do nível das demais células epidérmicas, que diferiu da face adaxial de *C. limon* que ocorre no mesmo nível (Fig. 5). Ao se considerar as observações de ESAU (1977), a posição dos estômatos pode ser analisada em função de adaptações ecológicas da planta. Ou seja, estômatos localizados acima das células epidérmicas são associados a um ambiente com grande suprimento de água, enquanto estômatos localizados em depressões, em geral, indicam um *habitat* caracterizado pelo baixo suprimento de água. Portanto, as espécies com estômatos situados no mesmo nível como ocorre em uma das espécies estudadas, podem indicar condição de suprimento de água satisfatório.

O índice estomático, na face abaxial das folhas de *C. aurantium*, *C. aurantifolia* e *C. limon* foi de 15,12; 14,74 e 14,32, respectivamente. CAÑIZARES (2005) descreve em *Citrus latifolia*, índice estomático entre 27,27 a 91,83 no lado abaxial da folha, para o autor a estrutura anatômica está relacionada a adaptação de uma espécie para um determinado ambiente. O que evidencia um índice estomático alto para o gênero *Citrus* se comparado a outro gênero da família Rutaceae, demonstrado nos estudos de CAVALCANTE (2003) para o gênero *Ruta* com 8,10 de índice estomático.

Em ambas as faces das células epidérmicas de *C. aurantium* foram encontrados grãos de sílica, o que ainda não foi citado para a família Rutaceae (Fig. 3, 4).

Quanto a presença de hipoderme, as espécies estudadas apresentaram duas camadas na face abaxial. O *C. limon* distinguiu-se das outras espécies, pois apresentou uma camada de hipoderme também na face adaxial (Fig. 7). METCALFE e CHALK (1950) mencionaram que alguns membros da família Rutaceae apresentam uma ou mais camadas de hipoderme. Diferindo do gênero *Pilocarpus* estudado por MUNTOREANU (2008) que não apresentou hipoderme característica em nenhuma das espécies por ele estudadas.

Células de colênquima angular são encontradas abaixo da epiderme abaxial na região da nervura central (Fig. 6). As três espécies estudadas apresentam folha dorsiventral com variação de números de camadas de parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico clorofiliano encontra-se logo abaixo da epiderme na face adaxial de *C. aurantium* e *C. aurantifolia* e possui três camadas de células, seguido por várias camadas de parênquima lacunoso (Fig. 7). O *C. limon* apresentou uma camada de hipoderme na face adaxial, e duas camadas de parênquima paliçádico clorofiliano (Fig. 7). Concorda-se nesse estudo que o arranjo das células do parênquima paliçádico maximiza a eficiência da fotossíntese pelo posicionamento

das células em um ótimo ângulo para a chegada dos raios solares, como já observado por DICKISON (2000). GALLARDO & JIMÉNEZ (2002) mencionaram o parênquima paliçádico biestratificado como um caractere xeromórfico.

Quanto ao parênquima lacunoso, as espécies estudadas apresentaram de 9 a 11 camadas, formando espaços intercelulares (Fig. 7) chamados de grandes lacunas por METCALFE & CHALF (1950) e MARQUETE (1981).

As espécies estudadas apresentaram na nervura primária, feixe vascular colateral central, com xilema constituído por elementos de vasos com paredes secundárias espessadas helicoidalmente (Fig. 9). Ainda no mesfilo, todas as espécies apresentaram estruturas secretoras, sendo células e/ou cavidades (Fig. 8, 14). A característica mais marcante em Rutaceae é a presença de pontuações translúcidas nas folhas, que correspondem a cavidades glandulares multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos, típicos da família (MUNTOREANU, 2008).

O sistema secretor das folhas das três espécies estudadas é constituído por numerosas cavidades (Fig. 10-13), próximas a epiderme e na interfase entre o parênquima paliçádico e lacunoso.

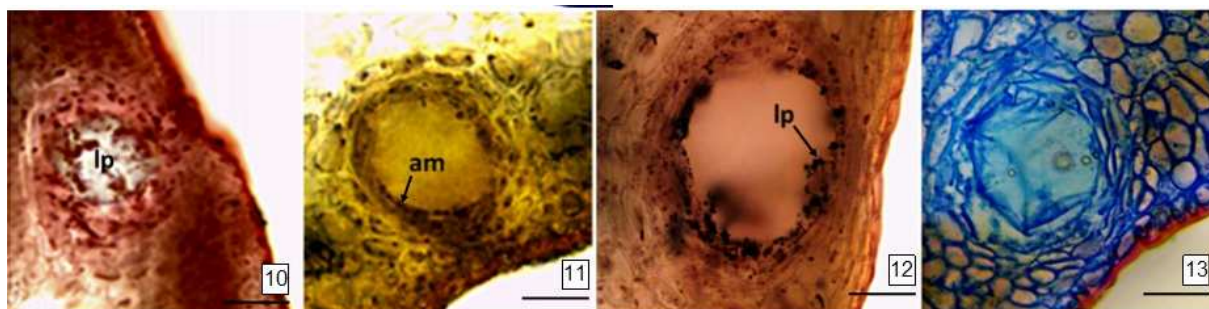


FIGURA 10-Sudan IV (positivo) em *C. aurantifolia*; **Figura 11-**Lugol (positivo) em *C. aurantium* **Figura 12-** Sudan IV (positivo) em *C. limon*. **Figura 13-** Sudan IV (positivo) em *C. limon*; (lp= lipídeos; am= amidos); Barras = 50 μ m (10, 11, 13); 40 μ m (12)

O padrão de distribuição e a frequência das estruturas secretoras são importantes para fins diagnósticos (BENNICI & TATI 2004). Na análise histoquímica dos espaços secretores foliares, a reação ao safrablau evidenciou as paredes ricas em celulose e a ausência de células lignificadas e suberificadas em todas as espécies (Fig. 13).

Testes histoquímicos realizados nas três espécies com Sudan IV evidenciaram substâncias lipofílicas nas células ao redor e no lúmen do espaço secretor (Fig. 10, 12), como também em células parenquimáticas do mesófilo e floemáticas de *C. limon*. No estudo com lugol somente o *C. aurantium* possuiu amido nas células ao redor do espaço secretor (Fig. 11), sendo ausente em *C. aurantifolia* e *C. limon*. Por meio do teste de floroglucina ácida evidenciou-se a ausência de lignina nas paredes dos espaços secretores, mostrando somente a presença nos elementos de vaso e nas fibras.

O pecíolo das três espécies estudadas apresentou epiderme uniestratificada; córtex composto por colênquima, parênquima e esclerênquima; tecido vascular fechado com fibras pericíclicas descontínuas e estruturas secretoras compostas por cavidades e células isoladas (Fig. 14-22).

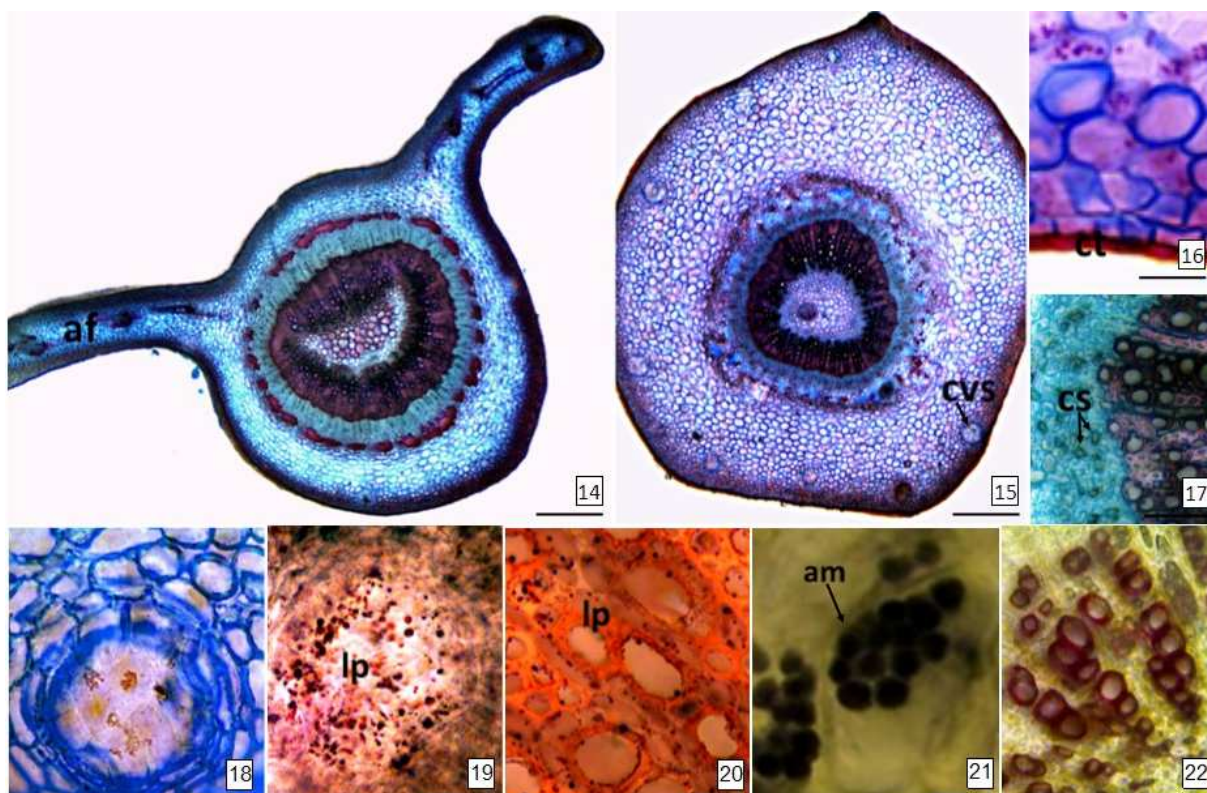


Figura 14-Visão geral do pecíolo de *C. aurantium*; **Figura 15-**Visão geral do pecíolo de *C. limon*; **Figura 16-**Detalhe da epiderme de *C. limon*; **Figura 17-**Detalhe do cilindro vascular de *C. aurantifolia*; **Figura 18-**Safrablau com resultado positivo em *C. aurantifolia*; **Figura 19-**Sudan IV com resultado positivo em *C. aurantium*; **Figura 20-**Sudan IV com resultado positivo, mostrando lipídios nas células xilemáticas em *C. limon*; **Figura 21-**Lugol com resultado positivo, mostrando grãos de amido disperso no mesófilo de *C. limon* **Figura 22-**Floroglucina ácida, com resultado positivo no xilema em *C. aurantium*. ct= cutícula, cvs= cavidade secretora, af= ala foliar; lp= lipídeos; am= amidos. Barras = 50 µm (22); 30 µm (21); 40 µm (16, 18, 19, 20); 120 µm (14.); 70 µm (15, 17).

Existem poucas informações sobre as características anatômicas do pecíolo de Rutaceae. Segundo HOWARD (1979) a estrutura anatômica do pecíolo é importante na identificação de táxons.

O contorno do pecíolo é côncavo-convexo em *C. aurantifolia* circular em *C. limon* (Fig.15) e apresenta alas laterais vascularizadas em *C. aurantium* (Fig. 14). No corte transversal, observou-se que as células da epiderme são aproximadamente isodiamétricas, com paredes espessadas em toda sua extensão, revestidas por cutícula espessa e lisa, diferindo apenas em *C. limon* que apresentou células epidérmicas retangulares (Fig. 16). Em todas as espécies estudadas foram encontrados estômatos com câmaras subestomáticas inconspícuas.

O pecíolo apresenta epiderme uniestratificada. O mesmo foi descrito para outros representantes da família por MARQUETE (1981) e MUNTOREANU (2008). O córtex é formado por células parenquimáticas e colenquimáticas do tipo angular. O colênquima apresentou vários estratos logo abaixo da epiderme. Foram mensurados 11 estratos de células parenquimáticas no córtex para o *C. aurantium*, aproximadamente 23 estratos para o *C. aurantium* e 21 para o *C. limon*.

Na região interna à epiderme, todas as espécies apresentaram estruturas secretoras, que podem ser cavidades e/ou células. As cavidades secretoras estavam localizadas próximo à epiderme (Fig. 15). Já as células secretoras, foram encontradas em toda região cortical (Fig. 17), no xilema, no floema, e na medula,

corroborando com os resultados obtidos por MUNTOREANU (2008). Em quase todos os representantes as duas estruturas secretoras foram observadas, exceto em *C. limon*, que não apresentou célula secretora no floema. Em *C. aurantifolia* foi possível observar uma quantidade maior de células secretoras no floema.

Quanto ao sistema vascular, todas as espécies analisadas apresentaram fibras pericíclicas descontínuas (Fig. 14, 15) e feixe vascular fechado (Fig. 14, 15). Disperso pelo xilema encontraram-se células com paredes espessadas e lignificadas, aqui entendidas como fibras (Fig. 14). De acordo com DONATO (2011) a organização anatômica do sistema vascular do pecíolo e da nervura mediana tem importância no conjunto de características que conduzem à diagnose das espécies em estudo. Na análise histoquímica dos espaços secretores encontrados no pecíolo das espécies analisadas, os testes realizados com safrablau (Fig. 18) e sudan IV (Fig. 19) obtiveram resultados positivos em *C. aurantium*. *C. limon* não apresentou resultado positivo aos testes com safrablau, floroglucina, lugol e sudan IV. É importante salientar que são evidentes as paredes lignificadas e gotículas lipídicas no xilema do sistema vascular (Fig. 20, 22), e grãos de amido (Fig. 21) disperso nas células corticais, em todas as espécies estudadas.

CONCLUSÕES

Todas as espécies estudadas no presente estudo compartilham dos seguintes caracteres anatômicos foliares: cutícula lisa e delgada, hipoderme abaixo da face epidérmica abaxial, estômatos anomocíticos, câmara subestomática pouco desenvolvida, estruturas secretoras (células e/ou cavidades) com substâncias lipofílicas, feixe vascular colateral, elementos de vasos com paredes secundárias helicoidais. Os caracteres anatômicos do pecíolo compartilhado por todas as espécies estudadas no presente trabalho são: epiderme uniestratificada estômatos com câmara subestomática inconspícuas, estruturas secretoras, fibras pericíclicas descontínuas e cilindro vascular fechado.

O *C. limon* apresentou como caractere diagnóstico, folhas anfiestomáticas, com estômatos adaxiais no mesmo nível das células epidérmicas, hipoderme abaixo de ambas as faces epidérmicas, dois estratos de parênquima paliçádico. No pecíolo apresentou forma circular, células epidérmicas retangulares e ausência de células secretoras no floema.

Os caracteres diagnósticos foliares para o *C. aurantium* foram a presença de grãos de sílica observados na epiderme e a presença de amido nas cavidades secretoras. Os caracteres diagnósticos peciolares consistiram na ala foliar que compõe a forma do pecíolo.

O *C. aurantifolia* apresentou contorno côncavo/convexo peciolar, que diferiu das demais espécies estudadas.

Algumas das características acima mencionadas também foram observadas nas demais espécies dos gêneros relacionados à Rutaceae. Além disso, tais características se mostraram importantes à caracterização geral das espécies.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pela concessão de bolsa à primeira autora.

REFERÊNCIAS

- BENNICI, A. TANI, C. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. **Flora**, Alemanha. v. 199, n. 1, p. 464–475, 2004.
- CAÑIZARES, A.; SANABRÍA M.; ROJAS E. Anatomía de la hoja de Lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka). **Revista UDO Agrícola**, Venezuela. v. 5, n 1, p. 68-73, 2005.
- CAVALCANTE, C. A. D; **Anatomia dos órgãos vegetativos de *Ruta graveolens* L. (rutaceae)**. 2003. 41f. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná.
- COSTA, J. F. O. A.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba. v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.
- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**: 53-55. Columbia University Press, New York. 1981.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. The New York Botanical Garden, New York. 555p. 1988.
- DICKINSON, M. E. in **Building Galaxies: from the Primordial Universe to the Present**. Editions Frontieres, Paris. 257p. 2000.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B. L.; Morfo-anatomia foliar de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 43-51, 2011.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2 ed. John Wileys and Sons, New York, 1977.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London. 1979.
- FERREIRA J. D.; PIZELLI, G. S.; PISANO, L. C.; PAIVA. G. A.; 2011. Plantas medicinais: uso e cultivo domiciliar no município de bauru-SP. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, São Paulo. v. 14, n. 25, p. 87-96, 2011.
- GALLARDO, L. H.; JIMÉNEZ, M. E. Leaf anatomy of *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). **Caldasia**, Caracas. v. 24, n. 2, p. 269-275, 2002.
- GOMES, S. M. A.; SILVA, E. A. M.; LOMBARDI, J. A.; AZEVEDO, A. A.; VALE, F. H. A. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo. v. 19, n. 4., p. 945-961, 2005.
- HOWARD, R. A. The petiole. In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds). **Anatomy of the dicotyledons**. Claredon Press, Oxford. v. 1, n. 1, p. 88-96, 1979.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice.** W.H. Freeman, San Francisco. 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique.** 1st ed. McGraw-Hill Book, New York. 1940.

KAISER, E. **Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine.** Botanisch zentralb, Stuttgart 1880.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** EDUR, Rio de Janeiro. 1997

MARQUETE, O. Anatomia e vascularização foliar e floral de *Pilocarpus organensis* Occhioni & Rizzini (Rutaceae). **Arquivo Jardim Botânico.** Rio de Janeiro. n. 25, p. 117-159, 1981.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons.** Claredon Press, Oxford. v. 2, n. 1. 1950.

MILLANI, A. A.; ROSSATTO, D. R.; RUBIN FILHO, C. J.; KOLB, R. M. Análise de crescimento e anatomia foliar da planta medicinal *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) cultivada em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais,** Botucatu. v. 12, n. 2, p. 127-134. 2010.

MUNTOREANU, T. G. **Descrição e mapeamento de caracteres morfoanatômicos foliares em *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae) e gêneros relacionados.** 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OGUNDIPE, O. T. Leaf anatomical studies on eleven species of *Zanthoxylum Linn.* (Rutaceae). **Phytomorphology, Delhi,** v. 52, n. 2/3, p. 103-112, 2002.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus spp.*, Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Journal for Economic Botany,** EUA. v. 51, n. 1, p. 49-58. 2001.

PIRANI, J. R. **Estudos taxonômicos em Rutaceae; revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), análise cladística de Pteleinae, sinopse de Rutaceae no Brasil.** Universidade de São Paulo, São Paulo (Tese de Livre Docência). 1999.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany,** St. Louis. v. 69, p. 921-38, 1982.

ROESER, K. R. Die Nadel der SchwarzKiefer. **Nassen produkt und Kunstwuk der Natur,** Mikrokosmos, v. 61, p. 33-36, 1972.

SPEGAZZINI, E. D; CASTRO, M. T.; ROSSI, L; CARPANO, S. M; NÁJERA, T. N. Micorgafia foliar cuali-cuantitativa de lãs espécies de *Pilocarpus* (Rutaceae): *P.*

jaborandi Holmes, *P. microphyllus* stapf exwardleworth y p. *Pennatifolius* lem.
Dominguesia, Argentina. v. 18, n. 1, 2002.