

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2020.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES
EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE
Protium heptaphyllum (AUBL.) MARCHAND. (BURSERACEAE)

FERNANDA HELENA PALERMO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica)
Botânica, Área de concentração:
Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU – SP
-2018-



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES
EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE
Protium heptaphyllum (AUBL.) MARCHAND. (BURSERACEAE)

FERNANDA HELENA PALERMO

PROF^a DR^a TATIANE MARIA RODRIGUES
ORIENTADORA

DR^a AMANDA CRISTINA ESTEVES AMARO
CO-ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) Botânica, Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU – SP
-2018-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Palermo, Fernanda Helena.

Aspectos subcelulares e influência de fatores exógenos nos espaços secretores de resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) / Fernanda Helena Palermo. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Coorientador: Amanda Cristina Esteves Amaro

Capes: 20302037

1. Resinas. 2. Etileno. 3. Estruturas secretoras.
4. Ultraestrutura. 5. Breu-branco.

Palavras-chave: Breu-branco; Canais secretores; Etileno; Resina; Ultraestrutura.

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Marinez, e a minha irmã, Alessandra que sempre me apoiaram no sonho de ser bióloga e, com carinho, me ajudaram a tomar as decisões certas e seguir rumo à felicidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À Professora Dra. Tatiane Maria Rodrigues que por meio de sua orientação cuidadosa e ensinamentos, ao longo destes anos, se tornou um exemplo de profissional para mim. Agradeço pela oportunidade de ter realizado este trabalho do qual gosto tanto e tenho muito orgulho.

À Dra. Amanda C. E. Amaro, pela excelente coorientação, dedicação atenciosa e por ter me ensinado muito durante esses dois anos de trabalho.

À Professora Dra. Silvia R. Machado por sempre compartilhar seus conhecimentos valiosos e pela colaboração atenciosa neste trabalho, contribuindo para meu crescimento enquanto profissional.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica e do Departamento de Botânica, IBB, pela aprendizagem e assistência no processamento das amostras.

Ao Dr. Sérgio A. Adachi pela ajuda em campo e por todo o companheirismo de sempre e ao Luis Paulo Mantoan e Felipe Giroto por todos os ensinamentos e auxílio na montagem dos experimentos. Agradeço a todos por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação, Angélica, Bruna, Camila, Daiane, Jana, July, Katiane, Lorena, Tayeme, Thais e Wand, por esses anos muito agradáveis, com muita troca de conhecimento e momentos de descontração. Vocês foram muito importantes e ajudaram a manter tudo mais leve. Agradeço em especial aos amigos, Diana, Ivanilde, Juan, Ricardo e Stefany pela amizade e por tudo que aprendi com vocês dentro e fora do laboratório.

Ao meu pai, mãe e irmã, agradeço por todo o apoio e carinho. Vocês são meu porto seguro, meus amigos e exemplos de pessoa. Sinto todos os dias saudades de estar mais perto, mas carrego sempre vocês no coração.

Ao meu companheiro, André Luis, por trazer amor e leveza aos meus dias. Agradeço por sempre acreditar em meu trabalho, por todo o auxílio no trabalho de campo e por estes dois anos de convivência e compartilhamento de conhecimentos, ideias e momentos inesquecíveis.

À minha família Jahcarandá, Ana Liz, Eliza, Katiane e Marília pelos quatro anos de convivência que foram recheados de alegrias, histórias, ensinamentos e companheirismo. Espero ainda poder compartilhar muitos momentos com vocês ao longo desta vida.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a chegar aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS	11
CAPITULO I – The tridimensional branched and anastomosed secretory system in <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) under a developmental view	12
Resumo	12
Introdução	13
Material e métodos	14
Resultados	15
Discussão	17
Referências bibliográficas	20
Figuras e legendas	24
CAPITULO II – Influência do etileno no desenvolvimento dos espaços secretores de resina em <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (Burseraceae)	34
Resumo	34
Introdução	35
Material e métodos	36
Resultados	38
Discussão	39
Referências Bibliográficas	42
Tabela	48
Figuras e legendas	49
Considerações finais	53

PALERMO, F. H. ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE *Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND. 2018. 53p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo - Espécies de Burseraceae são conhecidas pela produção de resina utilizada na produção de incensos, repelentes, impermeabilizantes, medicamentos e cosméticos, além de conferir às plantas proteção contra herbívoros e patógenos. *Protium heptaphyllum* é uma espécie arbórea produtora de resina aromática com comprovada ação medicinal no tratamento de doenças respiratórias e do trato digestivo, dentre outras. Apresenta grande plasticidade quanto aos ambientes de ocorrência, estando presente em ecossistemas com características contrastantes em diferentes regiões do Brasil. Espaços secretores de resina ocorrem associados ao floema de raiz, caule e folhas, podendo formar uma rede anastomosada no caule. Esse trabalho teve como objetivo analisar os aspectos subcelulares envolvidos na origem, desenvolvimento e funcionamento dos espaços secretores de resina em *P. heptaphyllum*, além de avaliar a influência do etileno no desenvolvimento do sistema secretor. Amostras de caule jovem foram processadas para análise convencional e citoquímica em microscopia eletrônica de transmissão. Plantas jovens foram mantidas em casa de vegetação e submetidas a diferentes concentrações de Ethephon: 6g L⁻¹ (T1), 12g L⁻¹ (T2), 18g L⁻¹ (T3) e 24g L⁻¹ (T4); amostras de suas folhas e caule foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Os canais secretores se originam por esquizogênese e se desenvolvem por esquizolisogênese. As células epiteliais apresentam população de organelas consistente com secreção de lipídios, polissacarídeos e proteínas. Canais maduros podem se alongar, ramificar e fundir por processo que envolve separação e morte de células. Pectinase e celulase foram detectadas e estão associadas ao processo de expansão do sistema secretor e liberação da secreção. Folhas de plantas tratadas com Ethephon mostraram aumento na área do lume dos ES, o que pode estar relacionado à ação do etileno em processos de degradação da parede celular. No caule primário, plantas do T2 e T3 apresentaram diminuição na área do lume em comparação com o grupo controle e T1. No caule em crescimento secundário, plantas do T4 apresentaram maior densidade de ES; entretanto, nessa região caulinar, plantas do T2 e T4 apresentaram ES com menor área do lume. A resposta diferencial do sistema secretor em órgãos em estrutura primária e secundária pode estar relacionada à atuação distinta do hormônio nos diferentes meristemas. Nossos resultados podem fornecer subsídios para o estabelecimento de técnicas mais sustentáveis e eficientes de extração de resina dessa espécie.

Palavras-chave: breu-branco, canais secretores, desenvolvimento, etileno, resina, ultraestrutura

PALERMO, F. H. **SUBCELLULAR FEATURES AND INFLUENCE OF EXOGENOUS FACTORS ON THE RESIN SECRETORY SPACES IN *Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND.** 2018. 53p. MSc DISSERTATION – BIOCIEENCIA INSTITUTE, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Abstract - Burseraceae species are known for resin production used in the yield of incense, repellent, waterproofing, drugs and cosmetics, and also protect plants against herbivores and pathogens. *Protium heptaphyllum* is a tree producer of aromatic resin with medicinal action in respiratory and digestive diseases, among others. It occurs in many environments, being present in ecosystems with contrasting characteristics in different regions of Brazil. Resin secretory spaces (SS) occur associated with phloem in root, stem and leaves, and form an anastomosed network in the stem. We aimed to analyze the subcellular aspects involved in the origin, development and functioning of the resin secretory spaces in *P. heptaphyllum*, besides to evaluate the influence of ethylene on the development of the secretory system. Young stem samples were processed for conventional analysis and cytochemistry in transmission electron microscopy. Young plants were kept in greenhouse and treated with different concentrations of Ethephon: 6g L⁻¹ (T1), 12g L⁻¹ (T2), 18g L⁻¹ (T3) e 24g L⁻¹ (T4); leaf and stem samples were processed according to usual techniques in plant anatomy. Secretory canals in the phloem originated by schizogenesis and developed by schyzolysigenesis. Epithelial cells presented organelles consistent with lipid, polysaccharides and proteins secretion. Mature canals can elongate, ramify and fuse, resulting in a complex structure. Pectinase and cellulase were detected and are associated with expansion and processes of secretion release of the secretory system. Leaves from plants treated with Ethephon showed wider SS; this can be associated with the ethylene action in degradation processes of cell walls. In the primary stem, plants under T2 and T3 presented narrower lumen area in comparison to control group and T1. In secondary stem, plants under T4 exhibited higher density of SS; however, in this stem region, plants under T2 and T4 showed SS with narrower lumen. The differential answering of the secretory system between organs under primary and secondary growth can be associated with the distinctive action of ethylene on the different meristems. Our results can provide subsidies to the establishment of more sustainable and efficient techniques of resin extraction in this species.

Keywords: breu-branco, secretory canals, development, ethylene, resin, ultrastructure

Introdução geral

Espaços secretores (canais e cavidades) são estruturas secretoras internas constituídas por um epitélio de células secretoras especializadas que delimitam um espaço intercelular (lume), onde a secreção produzida se acumula (Fahn 1979). A diferenciação entre cavidades e canais secretores é baseada em seus aspectos morfológicos em secções longitudinais, sendo que cavidades secretoras apresentam lume esférico ou ovóide, enquanto que os canais secretores mostram-se alongados e com lume estreito em plano longitudinal (Fahn 1979).

Cavidades e canais secretores podem se originar por: a) lisogênese, processo que envolve a desintegração (lise) de células para a formação do lume; b) esquizogênese, no qual o afastamento das células epiteliais pela dissolução da lamela média resulta na formação do lume; e c) esquizolisogênese, processo que envolve uma combinação entre afastamento e morte celular (Fahn 1979; Evert 2013).

As substâncias produzidas pelos espaços secretores podem apresentar natureza química diversa, podendo conter óleos essenciais, resinas, mucilagem, proteínas, compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, dentre outras (Metcalf & Chalk 1950; Fahn 1979; Castro & Machado 2006; Donato & Morretes 2007; Rodrigues & Fett-Neto 2009; Rocha *et al.* 2011; Rodrigues *et al.* 2011a). Dentre essas substâncias, merecem destaque os terpenos, substâncias com reconhecida importância ecológica e econômica, representados pelos óleos-essenciais e pelas resinas (Langenheim 2003). Os óleos essenciais são terpenos voláteis de baixo peso molecular, enquanto que as resinas são formadas por uma mistura de terpenos voláteis e não-voláteis (Langenheim 2003). Entre os principais produtores de resina estão famílias pertencentes às gimnospermas, às monocotiledôneas e às eudicotiledôneas, dentre elas Burseraceae (Langenheim 2003).

As características ultraestruturais das células epiteliais de canais e cavidades secretores variam conforme a composição da secreção produzida (Fahn 1979; Evert 2006). Dictiosomos ativos na produção de vesículas caracterizam o citoplasma de células produtoras de material hidrofílico (Fahn 2000; Rodrigues *et al.* 2011b). Em células ativas na secreção de substâncias lipofílicas, a presença de retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, plastídios desprovidos de tilacóides e abundância de gotas de óleo no citoplasma são características tipicamente observadas (Fahn 1979; Paiva & Machado 2007; Rodrigues *et al.* 2011a). Em células produtoras de proteínas, o citoplasma é caracterizado pela abundância de ribossomos e pela proliferação do retículo endoplasmático rugoso (Evert 2013).

A liberação da secreção das células epiteliais para o lume pode ocorrer por mecanismo holócrino ou merócrino (écrino e granulócrino). A presença de vesículas próximas à membrana plasmática pode indicar secreção granulócrina, onde as vesículas produzidas por dictiossomos e retículo endoplasmático se fundem à membrana plasmática, liberando seu conteúdo por exocitose. Já na secreção écrina as substâncias atravessam diretamente a membrana plasmática, por mecanismos de transporte ativo ou passivo. Na secreção holócrina, o conteúdo produzido é liberado pela dissolução ou lise das células epiteliais (Fahn 1979; Evert 2013).

Apesar da presença dos espaços secretores representar um caráter constitutivo em muitos grupos de plantas, fatores externos podem influenciar no desenvolvimento de canais e cavidades, assim como na quantidade e composição química da secreção produzida (Langenheim 2003; Rodrigues *et al.* 2014). Intensidade luminosa, temperatura, altitude, disponibilidade de água e nutrientes, ataque de herbívoros e patógenos, ferimentos dentre outros fatores, podem induzir mudanças nos aspectos morfológicos, subcelulares e funcionais do sistema secretor de espécies pertencentes a diversas famílias (Fahn & Benayoun 1976; Nair *et al.* 1980, 1985; Lin *et al.* 2001; Sheue *et al.* 2003; Moreira *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2014).

De forma geral, o estresse provocado por fatores bióticos ou abióticos é capaz de promover a liberação de grandes quantidades de hormônios no corpo vegetal, dentre eles o etileno (Taiz & Zeiger 2009). O etileno é um hormônio gasoso que regula muitos processos durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (Trobacher 2009) e é um importante mediador das respostas das plantas ao estresse provocado por fatores bióticos e abióticos (Wang & Ecker 2002). Trabalhos mostram que a aplicação de Ethephon em sua forma sintética pode induzir a formação de espaços secretores em espécies vegetais (Nair *et al.* 1985), além de induzir o aumento do diâmetro dos espaços secretores (Tomás *et al.* 1993) e aumentar de forma significativa a quantidade da produção da secreção produzida (Bhatt 1989; Scarazatti 2011; Zuñiga 2013).

Espécies de Burseraceae são caracterizadas pela presença constitutiva de canais secretores de resina associados ao floema (Metcalf & Chalk 1950). A resina produzida por espécies de Burseraceae é fortemente aromática (Langenheim 2003) e apresenta importância ecológica conferindo às plantas proteção contra ataques de herbívoros e patógenos (Bowers *et al.* 2001). Além disso, apresenta grande importância econômica, sendo amplamente utilizada na produção de fármacos, cosméticos (Souza *et al.* 2016) e incensos, dentre outros (Tolera 2013). Ainda, merece ser mencionado o valor histórico da secreção produzida por espécies da

família. Registros de seu uso datam desde a época do Egito faraônico (3000 a.C), onde se utilizava óleo de mirra (*Commiphora myrrha*) para o embalsamento dos mortos (Langenheim 2003). Outros povos também se utilizavam desta matéria prima, como os Sumérios, Babilônios e Assírios, indicando um amplo comércio na região do sudeste da Arábia (Groom 1981; Langenheim 2003). O incenso e mirra, muito utilizados em cerimônias religiosas e citados em passagens bíblicas são extraídos, respectivamente, de espécies pertencentes aos gêneros *Boswellia* e *Commiphora* (Tolera 2013). Na região das Américas, o uso da resina de copal (*Protium copal*) pela civilização Maia, data de 600 d.C., sendo muito utilizado também em suas cerimônias religiosas (Tripplett 1999; Langenheim 2003).

Apesar da importância de Burseraceae na produção de resina com alto valor ecológico, econômico e histórico, os estudos morfológicos sobre o sistema secretor em membros da família são escassos e restritos a um pequeno número de espécies, principalmente no que se refere aos aspectos subcelulares envolvidos no desenvolvimento e funcionamento dos canais secretores. Em *Commiphora mukul*, Setial *et al.* (1977) observaram que os canais secretores no floema caulinar se desenvolvem por esquizogenia e suas células apresentam maquinaria para intensa síntese lipídica e proteica. Nessa mesma espécie, Nair *et al.* (1981) mostraram que precursores da resina são produzidos no citoplasma das células epiteliais e que a secreção atravessa a parede celular para se depositar no lume do canal.

Bhatt (1987) por meio de microscopia eletrônica de transmissão analisou o processo de origem e desenvolvimento dos canais secretores no caule de *Commiphora wightii* e notou que o início de um espaço secretor é sinalizado pela formação de um espaço esquizógeno entre um grupo de células procambiais. Em embriões somáticos dessa mesma espécie produzidos *in vitro*, Kumar *et al.* (2004) observaram que canais secretores de resina estão presentes desde a fase de torpedo e que grande quantidade de resina é produzida em culturas de tecido. Shah *et al.* (1980) registraram a alta atividade enzimática das células epiteliais dos canais de *Commiphora mukul* e *Boswellia serrata* o que foi atribuído aos processos de degradação e conversão de substâncias durante a diferenciação dos canais e síntese da secreção.

Tolera *et al.* (2013) encontraram canais secretores de resina no lenho e na casca do caule de *Boswellia papyrifera*; os autores observaram que o sistema secretor forma uma rede tridimensional na porção mais interna da casca, enquanto que no lenho ocorrem canais apenas no sentido axial; segundo os autores, a distribuição e arquitetura dos canais de resina pode ter implicações para o estabelecimento de técnicas de extração mais sustentáveis da secreção. Em 2016, Souza *et al.* descreveram a presença de canais secretores associados ao floema de

quatro espécies de *Protium* e observaram variações na composição dos óleos essenciais entre elas.

No Brasil, o gênero *Protium* Burm. f é o mais comum dentre as Burseraceae, havendo registros de 35 espécies (Rankin-de-Mérona *et al.* 1992; Daly & Fine 2011). Estudos têm investigado a composição química da secreção produzida por espécies deste gênero (Bandeira 2002; Rudiger *et al.* 2007; Marques 2010, Lima *et al.* 2016) e têm demonstrado a importância farmacêutica e biológica de seus produtos (Otuki 2005; Souza *et al.* 2016).

Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand, é uma espécie arbórea conhecida como breu-branco ou almecega. Apresenta ampla distribuição no Brasil ocorrendo nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do país (Bandeira *et al.* 2002; Citó *et al.* 2006; Daly & Fine 2011). A resina que exsuda de seu tronco e folhas, além de servir como fonte de recursos para a indústria farmacêutica, é fonte de matéria-prima utilizada na fabricação de cosméticos, produtos de higiene, repelentes, vernizes, incensos e velas (Siani *et al.* 1999; Revilla 2001; Bandeira *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2005; Amaral *et al.* 2006; Pontes *et al.* 2007; Marques *et al.* 2010). Estudo recente relata a ocorrência de espaços secretores de resina associados ao floema de raiz e caule em estrutura primária e secundária e folhas de indivíduos de *P. heptaphyllum* (Rodrigues 2017). No caule, Rodrigues (2017) observou que os canais secretores sofrem processo de expansão e anastomose mesmo em órgãos já diferenciados. Entretanto, estudos ultraestruturais detalhados envolvendo técnicas específicas que permitam o entendimento do processo de expansão e fusão glandular não foram encontrados para espécies da família. Tampouco, foram encontradas informações sobre os aspectos ultraestruturais envolvidos na origem e funcionamento (síntese, acúmulo e liberação da secreção) do sistema secretor em *P. heptaphyllum*.

O sistema secretor de *P. heptaphyllum* parece apresentar plasticidade de desenvolvimento no que se refere ao número e tamanho dos espaços secretores em resposta a fatores exógenos. Rodrigues (2017) mostrou que indivíduos adultos de *P. heptaphyllum* vivendo em ambiente naturalmente alagável pelo pulso das marés em área de restinga apresentaram espaços secretores mais numerosos e com lume mais amplo em folhas e caule em estrutura primária, além de espaços secretores com área do lume duas vezes maior em caule em estrutura secundária, em comparação com indivíduos ocorrentes em áreas não-alagáveis.

Este trabalho teve como objetivo analisar os aspectos subcelulares envolvidos na origem, desenvolvimento e funcionamento dos espaços secretores de resina em *P.*

heptaphyllum, além de avaliar a influência do etileno no desenvolvimento do sistema secretor dessa espécie.

Referências Bibliográficas

- Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO (2006) Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:696-720
- Bandeira PN, Machado MIL, Cavalcanti FS, Lemos TLG (2001) Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research* 13:33-34
- Bandeira PN, Pessoa ODL, Trevisan MTS, Lemos TLG (2002) Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Química Nova* 25:1078-1080
- Bhatt JR (1987) Development and structure of primary secretory ducts in the stem of *Commiphora wightii* (Burseraceae). *Annals of Botany* 60:405-416
- Bhatt JR, Nair MNB, Ram RYM (1989) Enhancement of oleo-gum-resin production in *Commiphora wighlii* by improved tapping technique. *Current Science* 58:349-357
- Bowers WS, Evans PH, Venable DL, Becerra JX (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41:865-876
- Castro MM, Machado SR (2006) Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Glória, B, Carmello-Guerreiro SM (Eds) *Anatomia Vegetal*. UFV, Viçosa, p.179-188
- Citó AGL, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VMM, Chaves MH (2006) Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8:4-7
- Daly DC, Fine WA (2011) A new amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalista taxa. *Studies in Neotropical Burseraceae XVI Systematic Botany* 36:939-949
- Donato AM, Morretes BL (2007) Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17:426-443
- Evert RF (2006) *Esau's Plant Anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body. Their structure, function and development*, 3rd edn. John Wiley and Sons, New Jersey

- Fahn A, Benayoun J (1976) Ultrastructure of resin ducts in *Pinus halepensis* development, possible sites of resin synthesis, and mode of its elimination from the protoplast. *Annals of Botany* 40:857-863
- Fahn A (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London
- Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31:37-75
- Groom N (1981) *Frankincense and myrrh: a study of the Arabian incense trade* Londres: Longman.
- Kumar S, Sonie KC, Ramawat KG (2004) Development of resin canals during somatic embryogenesis in callus cultures of *Commiphora wightii*. *Indian Journal of Biotechnology* 3:267-270
- Langenheim JH (2003) *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*. Timber Press, Portland, Cambridge
- Lima TAAC, Ribeiro JELS, Marques MOM, Facanali R, Lima MP (2016) Estimulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. *Scientia Amazonia* 5:21-24
- Lin J, Sampson DA, Ceulemans R (2001) The effect of crown position and tree age on resin-canals density in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Canadian Journal of Botany* 79:1257-1261
- Marques DD, Sartori RA, Lemos TLA, Machado LL, Souza JSN, Monte FJQ (2010) Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazônica* 40:227-230
- Metcalf CR, Chalk L (1950) *Anatomy of the dicotyledons leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economy uses*. Clarendon press, Oxford
- Moreira CGA, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Stangarlin JR, Cruz MES (2008) Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica* 34:332-337
- Nair MNB, Patel KR, Shah JJ, Pandalai RC (1980) Effect of Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on gummosis in the bark of *Azadirachta indica*. *Indian Journal of Experimental Biology* 18:500-503
- Nair GM, Patel KR, Subrahmanyam SV, Shah JJ (1981) Secretion of resin across the wall of the epithelial cell in the gum-resin canal of *Commiphora mukul* Engl. *Annals of Botany* 47:419-421

- Nair MNB, Bhatt JR, Shah JJ (1985) Induction of traumatic gum cavities in sapwood of the Neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) by Ethephon and paraquat. *Indian Journal of Experimental Biology* 23:60-64
- Oliveira FA, Costa CLS, Chaves MH, Almeida FRC, Cavalcante IJM, Lima AF, Lima Jr RCP, Silva RM, Campos AR, Santos FA, Rao VSN (2005) Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences* 77:2942-2952
- Otuki MF, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB (2005) Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507:253-259
- Paiva EAS, Machado SR (2007) Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany* 24:423-431
- Pontes WJT, Oliveira JCG de, Câmara CAG da, Lopes ACHR, Gondim-Júnior MGC, Oliveira JV de, Barros R, Schwartz MOE (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazônica* 37:103-110
- Rankin-de-Merona JM, Prance GT (1992) Preliminary results of a large-scale tree inventory of upland rain forest in the Central Amazon. *Acta Amazônica* 22:493-534
- Revilla J (2001) Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. SEBRAE-AM/INSPA, Manaus, MA
- Rocha J, Pimentel RR, Machado SR (2011) Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. *Acta Botânica Brasilica* 25:751-763
- Rodrigues KCS, Fett-Neto AG (2009) Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. *Industrial Crops and Products* 30:316-320
- Rodrigues MIA (2017) Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) com ênfase no sistema secretor em ambiente com influência das marés. Tese, Universidade Estadual Paulista
- Rodrigues TM, Santos DC, Machado SR (2011a) The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae- Papilionoideae). *Comptes Rendus Biologies* 334:535-543

- Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR (2011b) The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae - Caesalpinioideae). *Flora* 206:585-594
- Rodrigues TM, Buarque PFSM, Coneglian AG, Reis DC (2014) Light and temperature induce variations in the density and ultrastructure of the secretory spaces in the diesel-tree (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae) *Trees* 28:613-623
- Rudiger AL, Siani AC, Veiga Junior VF (2007) The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews* 1:93-103
- Scarazatti COS (2011) Produção de resina de Breu (Burseraceae) no assentamento rural Cristo Rei do Uatumã – Amazonas. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM
- Setia RC, Parthasarthy MV, Shah JJ (1977) Development, histochemistry and ultrastructure of gum-resin ducts in *Commiphora mukul* Engl. *Annals of Botany* 41:999-1004
- Shah JJ, Subramanyam SV, Nair GM, Patel KR (1980) Enzyme histochemistry in the gum-resin canals of some members of Burseraceae. *Proceedings of Indian National Science Academy B* 46:506-11
- Sheue CR, Yang YP, Kuo-Huang LL (2003) Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (Pinaceae) needles. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 44:305-313
- Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology* 66:57-69
- Souza LR, Trindade FG, Oliveira RA, Costa LCB, Gomes VM, Cunha M (2016) Histochemical characterization of secretory ducts and essential oil analysis of *Protium* species (Burseraceae). *Journal of Essential Oil Research* 28:166-171
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 848
- Tolera M, Menger D, Sass-Klaassen U, Sterck FJ, Copini P, Bongers F (2013) Resin secretory structures of *Boswellia papyrifera* and applications for frankincense yield. *Annals of Botany* 111:61-68
- Tomás AO, García-puig D, Sabater F, Porrás I, García-lídon A, Del río JA (1993) Influence of ethylene and Ethephon on the sesquiterpene nootkatone production in *Citrus paradisi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1566-1569
- Tripplett KJ (1999) The ethnobotany of plant resins in the Maya cultural region of southern Mexico and Central America. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin.

- Trobacher CP (2009) Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87:757-769
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene Biosynthesis and signaling networks. *The plant cell* 14:131-151
- Zuñiga RM (2013) Extração induzida de resina em duas espécies de *Protium* Burm f. e análise química do óleo essencial da resina em *P. strumosum* Daly, na reserva Florestal dolpho Ducke – AM. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Mestrado foram reunidos em dois artigos científicos para publicação, os quais são apresentados de acordo com as normas de periódicos da área (Comitê de Biodiversidade da Capes).

Artigo 1: The tridimensional branched and anastomosed secretory system in *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) under a developmental view – Redigido de acordo com as normas do periódico *Protoplasma* (A2 - Comitê de Biodiversidade da Capes).

Artigo 2: Influência do etileno no desenvolvimento dos espaços secretores de resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) – Redigido de acordo com as normas do periódico *Trees* (B2 - Comitê de Biodiversidade da Capes).

Considerações finais

Este trabalho foi dedicado ao entendimento dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento dos espaços secretores de resina em *P. heptaphyllum*, além de contribuir para o conhecimento da influência de fatores exógenos no desenvolvimento do sistema secretor de resina em espécies nativas.

A utilização de técnicas convencionais e citoquímicas para detecção de enzimas (celulase e pectina) ao microscópio eletrônico de transmissão produziram informações importantes sobre as alterações celulares nos espaços secretores dessa espécie que levam ao alongamento, ramificação e fusão de canais, mesmo em órgãos maduros. As informações obtidas possibilitaram a complementação dos dados sobre a formação dessa complexa rede secretora tridimensional anastomosada responsável pela produção de resina com alto valor ecológico e econômico. Conhecer a estrutura do sistema secretor de resina em *P. heptaphyllum* e os aspectos celulares envolvidos em seu desenvolvimento pode ter implicações sobre a forma de extração do exsudato e gerar subsídios para o entendimento dos mecanismos de defesa da planta contra herbívoros.

Nossos resultados mostram que o estresse provocado pelo etileno liberado pela aplicação do Ethephon é capaz de induzir alterações estruturais no sistema secretor de *P. heptaphyllum*. A aplicação de Ethephon em plantas jovens produziu respostas diferenciais no sistema secretor em órgãos com estrutura primária e secundária, indicando que órgãos em diferentes estágios de desenvolvimento podem responder de formas distintas a situações de estresse. Esses dados são inéditos e abrem novas perspectivas para o estudo da influência de fatores exógenos no desenvolvimento e funcionamento de glândulas presentes em órgãos em crescimento primário e secundário. Pesquisas adicionais merecem também ser realizadas para verificar possíveis alterações subcelulares no sistema secretor e na quantidade e composição da secreção produzida por plantas sob diferentes concentrações de Ethephon.

Por fim, os dados obtidos com o desenvolvimento desse trabalho preenchem uma importante lacuna sobre os processos celulares envolvidos no estabelecimento da complexa rede secretora em *P. heptaphyllum*, além de subsidiar o estabelecimento de técnicas mais sustentáveis de extração da resina e o entendimento da tolerância das plantas ao estresse, ressaltando a necessidade de preservação dos ambientes em que ocorrem.