

LUIZ OLIVEIRA DA COSTA FILHO

**INTERAÇÃO TRÓFICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ULTRAESTRUTURA
DE CERAS EPICUTICULARES EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE**

Recife

2011

LUIZ OLIVEIRA DA COSTA FILHO

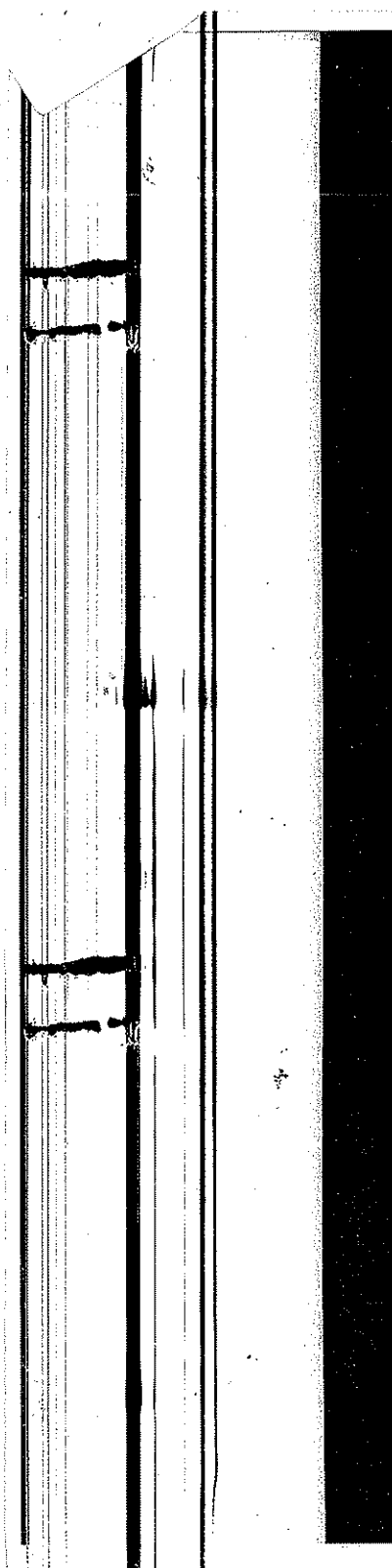
**INTERAÇÃO TRÓFICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ULTRAESTRUTURA
DE CERAS EPICUTICULARES EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Vegetal, do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Profa. Dra. Jarcilene Silva de Almeida-Cortez
Orientadora

Prof. Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira
Co-orientador

**Recife
2011**



Costa Filho, Luiz Oliveira da
Interação trófica, composição química e ultraestrutura de ceras epicuticulares em espécies Euphorbiaceae/ Luiz Oliveira da Costa Filho – Recife: O Autor, 2011.

138 folhas : il., fig., tab.
Orientador: Jarcilene Silva de Almeida-Cortez
Co-Orientador: Antonio Fernando Moraes de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2011.
Inclui bibliografia e anexos

1. Euphorbiaceae 2. Cera 3. Biologia Vegetal I. Título.

583.69

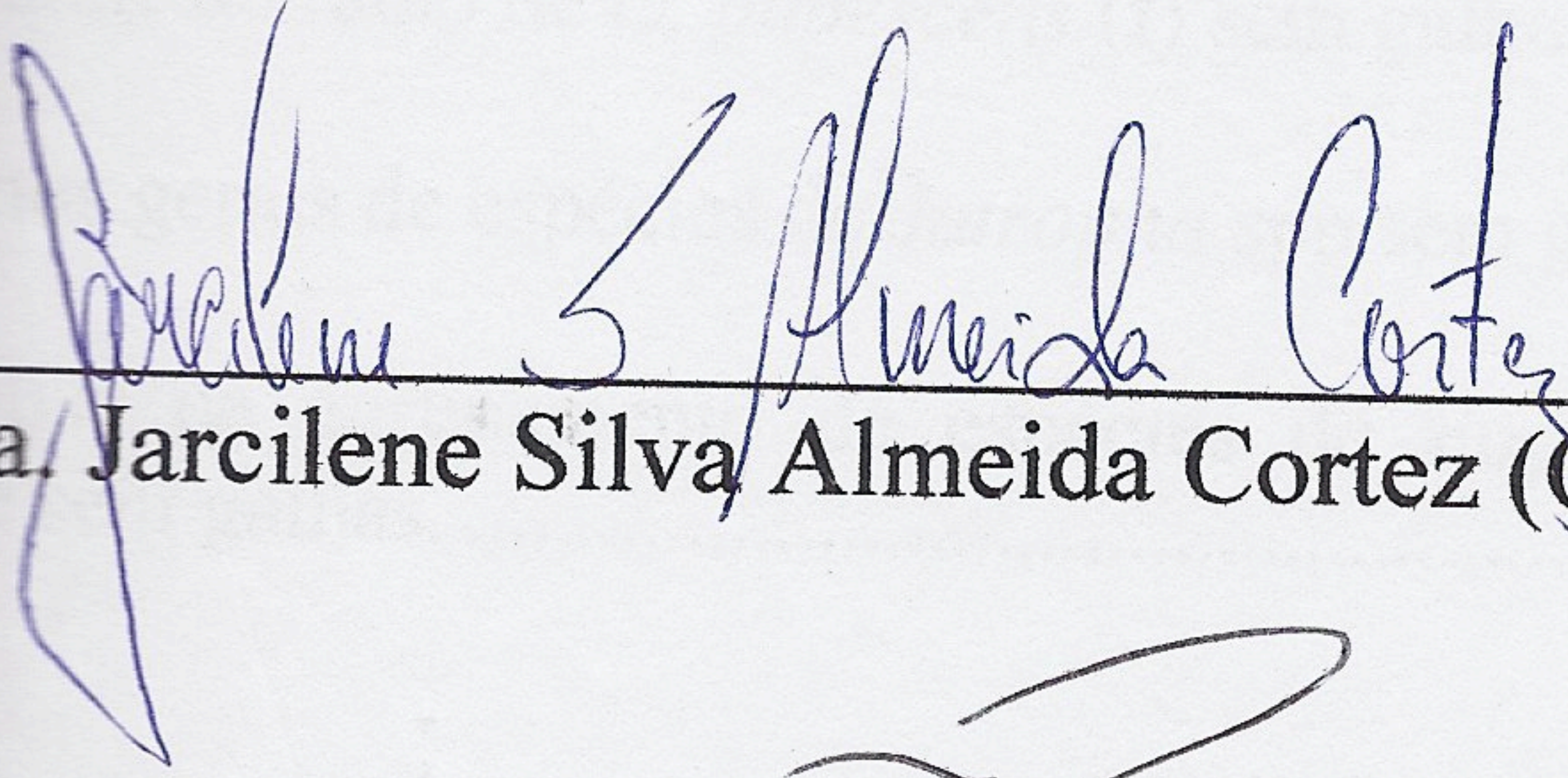
CDD (22.ed.)

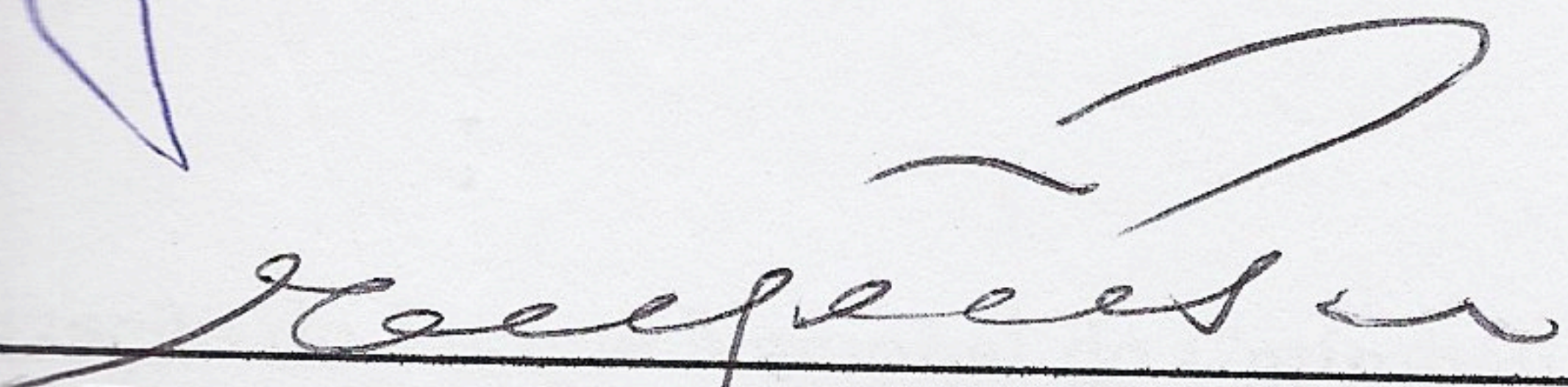
UFPE/CCB-2011-180

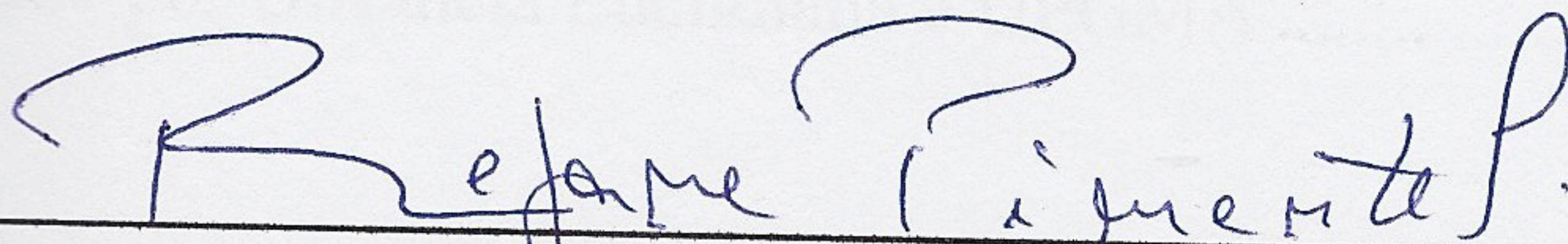
LUIZ OLIVEIRA DA COSTA FILHO

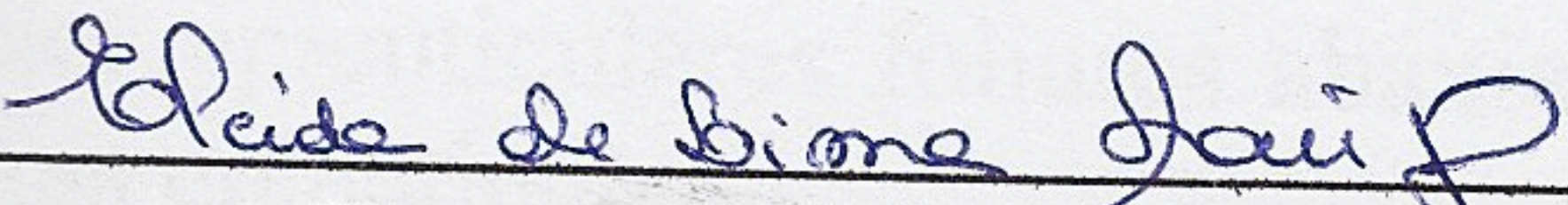
INTERAÇÃO TRÓFICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ESTRUTURA DE CERAS EPICUTICULARES EM
ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE”

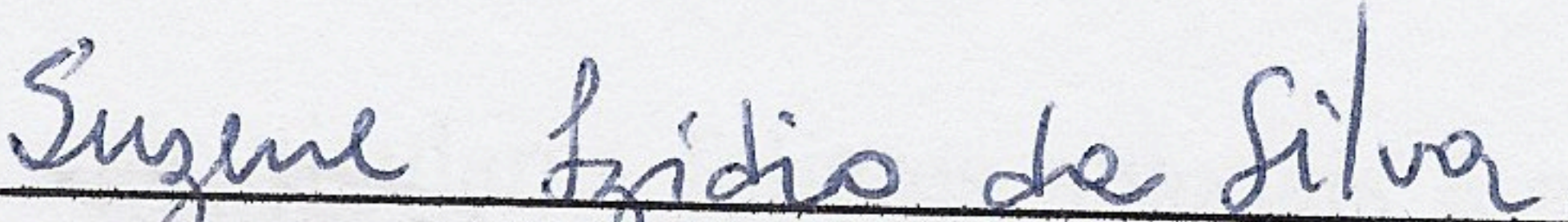
BANCA EXAMINADORA:


Dra. Jarcilene Silva Almeida Cortez (Orientadora) – UFPE


Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira – UFPE


Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel - UFRPE


Dra. Elcida de Lima Araújo - UFRPE


Dra. Suzene Izídio da Silva – UFRPE

Recife- PE
2011

“Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior.

A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe”.

Chico Xavier.

"Um dia, quando olhares para trás, verás
que os dias mais belos foram aqueles em
que lutaste."

Sigmund Freud.

Dedico:

À minha família, em especial,
Mônica, Ingrid e Yuri, que em
muitas ocasiões me viam, mas não
podiam me ter.

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade de mais esse pequeno passo no longo caminho evolutivo.

Aos orientadores e amigos, Fernando Oliveira e Jarcilene Almeida-Cortez (Departamento de Botânica - UFPE), pela orientação e apoio.

Aos professores Suzene Izídio (Departamento de Biologia – UFRPE), Eugênia Pereira (Departamento Ciências Geográficas – UFPE) e Nicácio Henrique (Departamento de Bioquímica – UFPE), pela amizade e contribuição oferecidas.

À Bióloga Máira Honorato pela contribuição, presteza e amizade ao longo da jornada.

Às professoras Gladys Flávia e Débora Santos (Departamento de Botânica - USP), por viabilizarem parte das análises, bem como pela acolhida em São Paulo.

Aos técnicos, João Virgílio (Departamento de Bioquímica - UFPE), João Amazonas (Herbário) e Francisco Rangel (CETENE) pelo competente apoio técnico.

À Coordenadora do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CETENE, Dra. Christina Peixoto pelo apoio.

Às instituições e laboratórios que viabilizaram os experimentos (UFPE, UFRPE, USP, CETENE).

À Associação de Guias do Vale do Catimbau pelo apoio de campo.

Aos órgãos de fomento CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

À Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco pela licença concedida para realização do curso.

A todos que deram a sua contribuição, seja incentivando, apoiando, criticando, e, até mesmo duvidando do êxito do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fisionomia das quatro áreas de coletas no PARNA do Catimbau.....52

Figura 2. Galhas foliares (a) e caulinares (b) em *Croton adamantinus*; (c) galhas foliares em *Croton argyrophyllus*; (d,e) galhas foliares em *Croton grewioides* e (f) galha foliar em *C. heliotropiifolius*.55

Figura 3. Galhas foliares em *Cnidoscolus urens* (a); galhas foliares em *C. loefgrenii* (b); galhas caulinares em *C. vitifolius* (c); galhas foliares (d) e caulinares (e) de *C. quercifolius*; detalhe do ramo de *C. pubescens* (f) sem galha.55

Figura 4. Aspectos gerais de espécies de *Jatropha* spp sem galhas.....55

Figura 5. Análise de agrupamento de espécies de Euphorbiaceae do PARNA do Catimbau com e sem galhas.56

CAPÍTULO 2

Figura 1. Localização do Parque Nacional do Catimbau e áreas de coleta.....67

Figura 2. Fenograma baseado no perfil de *n*-alcanos entre 15 espécies de Euphorbiaceae obtido por Distância Euclidiana e UPGMA73

CAPÍTULO 3

Figura 1. Superfícies epicuticulares foliares abaxial e adaxial de espécies de *Croton* evidenciando as ceras epicuticulares87

Figura 2. Superfícies epicuticulares foliares abaxial e adaxial de espécies de *Jatropha* evidenciando as ceras epicuticulares88

Figura 3. Superfícies epicuticulares foliares abaxial e adaxial de espécies de *Cnidoscolus* evidenciando as ceras epicuticulares88

Figura 4. Superfícies epicuticulares foliares abaxiais e adaxiais, respectivamente de *Manihot dichotoma*, *Sapium* sp. e *Microstachys hispida*89

Figura 5. Superfície foliar abaxial e adaxial de *Stilingia* sp e *Euphorbia heterophylla*, respectivamente (a,b,c,d,e,f)89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Ocorrência de galhas em 15 espécies de Euphorbiaceae estabelecidas no Parque Nacional do Catimbau.....	53
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Distribuição e abundância de <i>n</i> -alcanos epicuticulares foliares em espécies de Euphorbiaceae ocorrentes no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco-Brasil.....	70
--	----

SUMÁRIO

Agradecimentos

Lista de figuras

Lista de tabelas

1. Introdução	11
Literatura citada.....	13
2. Fundamentação Teórica.....	16
2.1. Composição química das ceras cuticulares	16
2.2. Ceras epicuticulares vegetais e implicações quimiotaxonômicas	20
2.3. Micromorfologia das ceras epicuticulares vegetais.....	23
2.4. Ceras epicuticulares e interações com insetos.....	27
Referências bibliográficas	30
<u>Capítulo 1: Galhas em espécies de Euphorbiaceae do semiárido brasileiro</u>	
(Parque Nacional Vale do Catimbau - PE, Brasil)	45
Resumo	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos	49
Resultados e discussão	51
Conclusão	57
Referências bibliográficas	58
<u>Capítulo 2: <i>n</i>-Alcanos cuticulares em algumas espécies de Euphorbiaceae do semi- árido (Pernambuco, Brasil): composição e aspectos quimiotaxonômicos.....</u>	
Resumo	63
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e métodos	66
Resultados e discussão	69
Conclusão	74
Referências bibliográficas	75

<u>Capítulo 3:</u> Caracterização micromorfológica da superfície epicuticular foliar de espécies de Euphorbiaceae do semiárido (Vale do Catimbau - PE, Brasil)	81
Resumo	82
Abstract.....	83
Introdução	84
Material e métodos	85
Resultados	86
Discussão	91
Referências bibliográficas	93
3. Considerações finais	97
4. Resumo	98
5. Abstract	99
6. Anexos.....	100

1. INTRODUÇÃO

A partir da exploração do ambiente terrestre pelas plantas há cerca de 460 milhões de anos, surgiram importantes características adaptativas, entre as quais a formação de uma membrana extracelular contínua e hidrofóbica, imprescindível para a manutenção do balanço hídrico, denominada cutícula (KOLATTUKUDY, 1980).

A importância da cutícula para os vegetais vai além da proteção contra a desidratação, uma vez que, como a superfície mais externa, representa a interface multifuncional entre a planta e o ambiente, sendo-lhe atribuídas diversas outras funções, como controle da radiação e da temperatura, transporte de substâncias, hidrofobicidade, redução da aderência de partículas, proteção contra danos mecânicos, poluentes e patógenos (BARTHLOTT e NEINHUIS, 1997; KOCH *et al.*, 2009). No entanto, para compreender a multifuncionalidade da cutícula vegetal é necessário conhecer as propriedades físicas e químicas das ceras cuticulares (MÜLLER, 2006).

A cutícula recobre a superfície primária das partes aéreas das plantas vasculares e algumas briófitas, sendo formada por uma matriz insolúvel de cutina e uma mistura de lipídios solúveis denominados coletivamente ceras.

As ceras mais internas e incorporadas à cutina são denominadas intracuticulares e as mais externas, epicuticulares (BARGEL *et al.*, 2006). Sobre a cera epicuticular é comum a presença de cristais em forma de filamentos, bastões, plaquetas, tubos, crostas, estruturas dendríticas, amorfas ou ainda formando filmes finos (KOLATTUKUDY, 1980; JEFFREE, 1996; BARTHLOTT *et al.*, 1998; HEREDIA, 2003). A arquitetura desses cristais é determinada, sobretudo, pelo componente químico predominante na cera, indicando a aparência da superfície cuticular (JETTER e RIEDERER, 1995).

Do ponto de vista químico, as ceras representam uma complexa mistura de hidrocarbonetos de cadeias alifáticas longas (20 a 60 átomos de carbonos) composta principalmente por *n*-alcanos, ácidos graxos livres, alcoóis primários e secundários, cetonas, aldeídos, ésteres, além de compostos cíclicos como triterpenos e flavonóides (SHEPHERD *et al.*, 1995; RIEDERER e MARKSTÄDTER, 1996; MULLER e RIEDERER, 2005). É bem aceito que o padrão químico caracteriza uma espécie vegetal, parte da planta ou fase de desenvolvimento (BAKER, 1982), podendo, assim, ser usada como ferramenta taxonômica. No entanto, diversos estudos têm demonstrado variações nas propriedades químicas e físicas dos lipídios cuticulares de acordo com

uma série de fatores endógenos e exógenos (BONDADA *et al.*, 1996; EIGENBRODE e JETTER, 2002; FELDHAAR *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FEDERLE e RHEINDT, 2005; MÜLLER e RIEDERER, 2005; KIM *et al.*, 2007; KOSMA *et al.*, 2009).

A cutícula representa ainda substrato para as variadas interações das plantas com herbívoros, especialmente os insetos, entre os quais os indutores de galhas, caracterizando seu importante papel ecológico. As galhas são alterações no tecido vegetal caracterizadas por hiperplasia/hipertrofia, determinado por agentes como insetos, nematóides, vírus, bactérias, fungos e ácaros (MANI, 1964).

A família Euphorbiaceae é a segunda mais representativa nos trópicos, sobretudo em regiões semi-áridas, destacando-se por sua plasticidade, diversidade morfológica e amplo espectro de metabólitos produzidos (FEDERLE e RHEINDT, 2005; SIMPSON, 2006).

Nesse contexto, o presente estudo visa investigar, pela primeira vez, os lipídios cuticulares de *Croton adamantinus* Müll. Arg., *C. argyrophyllus* Kunth, *C. grewoides* Baill., *C. blanchetianus* Baill., *C. glandulosus* L., *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. urticifolius* Lam., *Cnidoscolus pubescens* Pohl, *C. urens* Pohl, *C. vitifolius* (Mill.) Pohl, *C. quercifolius* Pohl, *C. loefgrenii* (Pax & K.Hoffm.), *Jatropha mollissima* Baill., *J. mutabilis* Baill. e *J. ribifolia* (Pohl) Baill.), em indivíduos estabelecidos no Parque Nacional do Catimbau (semiárido, NE, Brasil) quanto à composição química e à micromorfologia, além de avaliar a utilidade do perfil químico dos *n*-alcanos como ferramenta taxonômica para a família Euphorbiaceae. Investigou-se também a frequência de insetos galhadores associados à espécies de Euphorbiaceae estabelecidas em diferentes áreas do PARNA do Catimbau.

O trabalho aqui apresentado é constituído por três capítulos, nos quais serão abordados dados mais recentes da literatura, a metodologia utilizada, os resultados das análises e sua discussão. O primeiro capítulo traz um levantamento da ocorrência de galhas em 1.600 indivíduos de 15 espécies de Euphorbiaceae estabelecidas em quatro áreas do Parque Nacional do Catimbau. O capítulo dois detalha os métodos de obtenção das ceras epicuticulares e análise da classe química dos *n*-alcanos através de métodos cromatográficos. Neste capítulo, o perfil químico e o potencial quimiotaxonômico de 15 espécies de Euphorbiaceae serão apresentados, discutidos e testados pela primeira vez.

O terceiro capítulo apresenta dados da ultraestrutura das ceras epicuticulares, obtidos por Microscopia Eletrônica de Varredura, para 21 espécies de Euphorbiaceae.

LITERATURA CITADA

- BAKER, E.A. (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In **The Plant Cuticle**, Linnean Society Symposium Series (eds D.F. Cutler, K.L. Alvin & C.E. Price), Vol. 10, pp. 139–165. Academic Press, London.
- BARGEL, H.; KOCH, K.; CERMAN, Z. (2006). Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? **Functional Plant Biology** **33**: 893-910.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. **Planta** **202**:1-8.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society** **126**: 237-260.
- BONDADA, B.R.; OOSTERHUIS, D. M.; MURPHY, J.B.; KIM, K.S. (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. **Environmental and Experimental Botany**, **36**: 61-69.
- EIGENBRODE, S.D.; JETTER, R. (2002). Attachment to Plant Surface Waxes by an Insect Predator. **Integr.Comp.Biol.**, **42**: 1091–1099.
- FEDERLE, W.; RHEINDT, F. E. (2005). *Macaranga* ant-plants hide food from intruders: correlation of food presentation and presence of wax barriers analysed using phylogenetically independent contrasts. **Biological Journal of the Linnean Society**, **84**: 177-193
- FELDHAAR, H.; FIALA, B.; GADAU, J.; MOHAMED, M.; MASCHWITZ, U. (2003). Molecular phylogeny of *Crematogaster* subgenus *decacrema* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Macaranga* (Euphorbiaceae) trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **27**: 441-452.

- HEREDIA, A. (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1620**: 1-7.
- JEFFREE, C. E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer, M & Müller, C. (eds.). **Biology of the Plant Cuticle**. Blackwell Publishing. pp.11-125.
- JETTER, R.; RIEDERER, M. (1995). In vitro reconstitution of epicuticular wax crystals – formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols. **Botanica Acta**, **108**: 111-120.
- KIM, K.S.; PARK, S.H.; JENKS, M.A. (2007a) Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. **J. Plant Physiol.**, **164**: 1134-1143.
- KOCH, K.; ARTHLOTT, W. (2009). Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. **Phil. Trans. R. Soc. A**, **367**: 1487-1509.
- KOCH, K.; BHUSHAN, B.; BARTHLOTT, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. **Science** **54**: 137-178.
- KOLATTUKUDY, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. **Science** **208**: 990-1000.
- KOSMA, D.K.; BOURDENX, B.; BERNARD, A.; PARSONS, E.P.; LÜ, S.; JOUBÈS, J.; JENKS, M.A. (2009). The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. **Plant Physiology** **151**: 1918-1929.
- MANI, M.S. (1964). **Ecology of plant galls**. The Hague, Netherlands, Dr. W. Junk, 604p.
- MÜLLER C. (2006). Plant–insect interactions on cuticular surfaces. In: RIEDERER, M.; MÜLLER, C. eds. **Biology of the plant cuticle**. Oxford, UK: Blackwell. pp. 398-422.
- MÜLLER, C.; RIEDERER, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2621–2651.
- OLIVEIRA, A.F.M.; MEIRELLES, S.T.; SALATINO, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **75**: 431-439.

- RIEDERER, M.; MARKSTÄDTER, C. (1996). Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. (G. Kerstiens (ed.). In: **Plant cuticles: an integrated functional approach**. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, pp. 189-200.
- RIEDERER, R.; MULLER, C. (2006). **Biology of the plant cuticle**. Wiley-Blackwell. Annual Plant Reviews. Vol. **23**. 438p.
- SHEPHERD, T.; ROBERTSON, G.W.; GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A.N.E.; DUNCAN, G. (1995) Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede, **Phytochemistry** **40**: 407–417.
- SIMPSON, M. G. (2006) **Plant systematics**. Elsevier Academic Press, p. 259-269.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Composição química das ceras cuticulares

A cutícula vegetal está presente na maioria das plantas terrestres, representando a primeira superfície de contato da planta com o ambiente e atuando na regulação hídrica, controle da radiação solar, aderência de partículas, proteção contra patógenos e poluentes, além de servir como substrato para interações com insetos herbívoros, caracterizando-se como uma superfície multifuncional (KUNST e SAMUELS, 2003; MÜLLER, 2006; KOCH *et al.*, 2009).

Estruturalmente, a cutícula consiste de uma matriz de cutina impregnada com cera intracuticular e coberta por cera epicuticular (VERMEER *et al.*, 2003). A cutina é composta por ácidos graxos hidroxilados e epoxidados derivados de ácidos graxos saturados e insaturados, transportados do citoplasma das células epidérmicas antes de serem esterificados (HOLLOWAY, 1982; KOLATTUKUDY, 1996). Sobre a cera epicuticular é comum a presença de cristais com variadas formas que são determinadas pelo composto químico dominante (JEFFREE, 1986; BARTHLOTT *et al.*, 1998).

As ceras cuticulares são uma complexa mistura de hidrocarbonetos alifáticos de cadeias longas e compostos cíclicos (MÜLLER e RIEDERER, 2005) e sua biossíntese tem início com a síntese de ácidos graxos no plastídeo, seguido da formação de cadeias muito longas (24 a 34 carbonos), e o posterior processamento dos alcanos, álcoois secundários, cetonas, álcoois primários e ésteres de cera (KUNST e SAMUELS, 2003). Além da porção alifática da cera, várias quantidades de compostos cíclicos, como triterpenos ácidos pentacíclicos, triterpênicos alcoólicos, triterpenos cetônicos, podem estar presentes, bem como a presença de derivados do ácido hidro-xicinâmico, e flavonóides (RIEDERER e MARKSTÄDTER, 1996).

As principais classes de compostos das ceras cuticulares vegetais são os *n*-alcanos (comprimento de cadeia C21 a C35), álcoois primários (C22 a C40), ácidos graxos (C20 a C24), aldeídos (C24 a C36), álcoois secundários (C21 a C35), cetonas (C21 a C35), dicetonas (C22 a C36) e ésteres *n*-alquil (C36 a C60), resultantes da combinação de álcoois primários e ácidos graxos de cadeias longas (BAKER, 1982; WALTON, 1990; SHEPHERD *et al.*, 1995). Cada classe é composta de uma série homóloga de isômeros e, em muitos casos, um único composto domina a composição

total da cera cuticular. É bem aceito que o padrão químico caracteriza uma espécie vegetal, parte da planta ou fase de desenvolvimento (BAKER, 1982), além de determinar as propriedades funcionais das ceras.

Diversos estudos têm mostrado grandes variações nas propriedades químicas e físicas das ceras cuticulares em diferentes taxa, sendo tais variações atribuídas à influência de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre os quais, estado ontogenético (JETTER e SCHÄFFER, 2001; FICKE *et al.*, 2004), idade da planta (RIEDERER e MARKSTÄDTER, 1996), fitogeografia (OLIVEIRA *et al.*, 2003; ROMMERSKIRCHEN *et al.*, 2006), época do ano (GÜLZ *et al.*, 1991; GÜLZ *et al.*, 1992; FAINI *et al.*, 1999; JENKS *et al.*, 2002), a temperatura (REED e TUKEY, 1982; DODD e AFZAL - RAFII, 2000; DODD e POVEDA, 2003; WEI *et al.*, 2008), luz (VON WETTSTEIN - KNOWLES *et al.*, 1980; STEINMÜLLER e TEVINI, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1995; GORDON *et al.*, 1997; FUKUDA *et al.*, 2008), além da concentração de dióxido de carbono, ozônio e SO₂ (SHELVEY *et al.*, 1986; PERCY *et al.*, 2002).

Variações nos padrões químicos das ceras têm sido evidenciadas mesmo em grupos próximos. Markstädter *et al.* (2000) detectaram os triterpenos como majoritários (concentrações de 52%-88%) em ceras epicuticulares caulinares de 16 espécies de *Macaranga* (Euphorbiaceae). Em seguida, Guhling *et al.* (2005) observaram maior presença de álcool primário (>70%), nas ceras epicuticulares foliares de plantas do mesmo gênero.

Em *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), Vermeer *et al.* (2003) observaram o predomínio de alcoóis primários (> 48%) em ceras foliares, enquanto, Guhling *et al.* (2006), estudando os cristais de ceras em caules de dois fenótipos da mesma espécie, constataram a presença majoritária do triterpenóide lupeol em elevadas concentrações, como sendo responsável pela formação dos cristais de cera em toda a superfície do caule. Escalante-Erosa *et al.* (2004) identificaram nas ceras foliares de *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae) o predomínio de três triterpenos: amirenona, acetato de β -amirina e acetato de α -amirina.

Diferenças entre ceras epicuticulares e intracuticulares também são reportadas. Por exemplo, Jetter *et al.* (2000) observaram a superfície epicuticular de *Prunus laurocerasus* (Rosaceae) totalmete dominada por compostos alifáticos, sobretudo *n*-alcanos (72%), enquanto as ceras intracuticulares apresentaram 63% de triterpenos. Já

Guhling *et al.* (2005), detectaram o predomínio de álcool primário nos cristais de ceras epicuticulares e de triterpenos alcoólicos alfa-amirina, beta-amirina e lupeol na camada intracuticular de *Macaranga tanarius*. Maarseveen e Jetter (2009) analisando as ceras cuticulares de *Kalanchoe daigremontiana* observaram predomínio de compostos de cadeias muito longas, principalmente *n*-alcanos, na fração epicuticular, enquanto os triterpenos dominaram as ceras intracuticulares.

Entre as classes químicas presentes nas ceras cuticulares, os *n*-alcanos, juntamente com os triterpenos, são citados por alguns autores como predominantes em diversas espécies (BAKER, 1982; JETTER *et al.*, 2000; KNUST e SAMUELS, 2003). Os alcanos foram encontrados, majoritariamente, na cera epicuticular foliar de *Pisum sativum*, induzindo a formação de cristais com variadas formas (GNIWOTTA *et al.*, 2005), essa classe predominou também em caules de *Arabidopsis thaliana* (JETTER *et al.*, 2007). Maarseveene e Jetter (2009) observaram a formação de cristais em forma de plaquetas com margens sinuosas em *Kalanchoe daigremontiana* em ceras dominadas por alcanos e sugerem que esses compostos, juntamente com os triterpenóides, podem estar envolvidos na formação desses cristais. A atividade biológica dos *n*-alcanos epicuticulares foi mostrada por Yang *et al.* (1993), ao observarem que larvas de *Spodoptera frugiperda* movem-se mais rapidamente em folhas de milho que apresentam maiores proporções de *n*-alcanos. Posteriormente, Li e Ishikawa (2005), constataram que a mistura de *n*-alcanos e ácidos graxos livres em ceras de folhas de *Fallopia japonica* (Polygonaceae) estimularam naturalmente a oviposição de *Ostrinia latipennis* (Lepdóptera).

Em ambientes com restrição hídrica e sob temperaturas elevadas, os *n*-alcanos, juntamente com os triterpenos alcoólicos assumem importante papel no controle da transpiração, devido ao maior caráter hidrofóbico que confere às ceras vegetais, indicando ser a composição química mais relevante que a espessura da cutícula no controle hídrico (KERSTIENS, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Segundo Rommerskirchen *et al.* (2006), gramíneas C4 de áreas tropicais e subtropicais extremamente áridas, contêm altas quantidades de homólogos com longas cadeias de *n*-alcanos.

A relação *n*-alcanos-estresse foi documentada para algumas plantas cultivadas. Kim *et al.* (2007a) com cultivares de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidos a estresse hídrico por 15 dias, observaram um incremento de 30% no teor total de cera e

um aumento de 34% na concentração de *n*-alcanos. Recentemente, Kosma *et al.* (2009), submetendo plantas de *Arabidopsis thaliana* a diferentes tipos de estresse, observaram substancial aumento no teor de lipídios cuticulares por unidade de área de 32% para 80%, devido, principalmente, ao aumento de 29% para 98% na concentração de alcanos. Resultados semelhantes foram obtidos por Bondada *et al.* (1996) e Kim *et al.* (2007b), os quais constataram o aumento na concentração dos *n*-alcanos como resposta fisiológica ao estresse hídrico para cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum*) e de soja (*Glycine max*), respectivamente.

Estudando as ceras de caules e folhas de mutantes de *Arabidopsis* (Brassicaceae), Jenks *et al.* (1995) identificaram a presença do alcano nonacosano (C29) dominando a cera caulinar e untriacontano (C31) como majoritário na ceras foliares, resultados confirmados por Knust e Samuels (2003), que apontaram o domínio dos *n*-alcanos (38%) na cera total de *Arabidopsis thaliana* e associaram o predomínio desses hidrocarbonetos na camada mais externa da cutícula (cera epicuticular) à função protetora. Perfil semelhante foi observado por Buschhaus *et al.* (2007), comparando a composição química entre ceras epicuticular e intracuticular de folhas de *Ligustrum vulgare* (Oleaceae) e constatando que a camada de cera exterior, tipo filme, era totalmente composta por classes de compostos alifáticos de cadeias muito longas, tendo o *n*-alcano tritriacontano (C33) como majoritário, enquanto a camada interna de cera foi dominada por triterpenóides cíclicos (66%), principalmente ácidos ursólico e oleanólico.

Por outro lado, outras classes aparecem como majoritárias em diferentes grupos de plantas. Balsdon *et al.* (1995), estudando as ceras de híbridos de azaléia (*Rhododendron* spp.), detectaram o predomínio do triterpenóide ácido ursólico nas ceras epicuticulares; aldeídos foram identificados como majoritários em *Nepenthes alata* (RIEDEL *et al.*, 2003; GORB *et al.*, 2005; DRAGOTA *et al.*, 2007), onde se observou o domínio do álcool secundário nonacosan-10-ol em ceras de *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). Xu *et al.* (2009) constataram a presença de ácidos graxos (ácido hexadecanóico > 35%), álcoois e alcanos como classes majoritárias em cristais de cera do musgo *Syntrichia caninervis*. Cetonas foram encontradas em plaquetas de ceras epicuticulares de *Allium porrum* e algumas espécies *Euphorbia* (JEFFREE *et al.*, 1975; BAKER, 1982; KOCH *et al.*, 2006).

2.2. *Ceras epicuticulares vegetais e implicações quimiotaxonômicas*

A família Euphorbiaceae se constitui em uma das mais numerosas com, aproximadamente, 320 gêneros e 8.000 espécies distribuídas, sobretudo, nos trópicos e subtropicais (CRONQUIST, 1981; WEBSTER, 1994), representando um dos taxa mais complexos do ponto de vista morfológico, taxonômico e fitoquímico entre as eudicotiledônias (AHMAD, 1996; FEDERLE e RHEINDT, 2005; SOLTIS *et al.*, 2005; SIMPSON, 2006). No Brasil ocorrem cerca de 70 gêneros, com 1.100 espécies habitando variados tipos vegetacionais (BARROSO, 1984), sendo a segunda família mais representativa em número de espécies no semi-árido (SAMPAIO, 1995). De acordo com Barbosa *et al.* (1996), cerca de 500 espécies habitam no nordeste, sendo a maioria em áreas de Caatinga, com algumas consideradas endêmicas, o que caracteriza a região Nordeste como centro de diversidade da família Euphorbiaceae (QUEIROZ, 2008; SÁTIRO e ROQUE, 2008).

Em função do elevado número de espécies e da diversidade fenotípica, não são raros os problemas taxonômicos na família Euphorbiaceae. Segundo Lucena (2009), o problema torna-se maior devido à má delimitação entre os taxa, acrescentando-se os erros de identificação, coleções botânicas incompatíveis com a riqueza, além da escassez de recursos humanos, bem como de bancos de dados sobre a família, notadamente na região nordeste.

Entre as várias ferramentas com potencial para solucionar problemas taxonômicos, a utilização de marcadores moleculares, nos últimos anos, tem-se mostrado eficaz (WURDACK *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 2005; KULJU *et al.*, 2007), no entanto, compostos químicos, como os lipídios cuticulares, podem ser usados como apoio adicional, por exemplo, para árvores moleculares baseadas em DNA *rbcl*, sendo úteis em estudos comparativos de classes de compostos secundários (GRAYER *et al.*, 1999). Pamidimarri *et al.* (2008), buscando agrupar filogeneticamente sete espécies de *Jatropha* utilizando seqüência de marcadores moleculares ITS e comparar com análises baseadas em sistemas de marcadores multilocus, observaram pequenas variações de agrupamento entre os dois métodos. Estas variações permitem considerar que apesar da eficácia dos métodos moleculares, o uso de marcadores químicos representa importante ferramenta para ajudar a solucionar problemas sistemáticos isoladamente ou associado a outros métodos.

Nesse aspecto, os lipídios cuticulares, denominados genericamente como ceras cuticulares, assumem importância como potencial ferramenta taxonômica, a partir de sua composição química e morfologia. Esses lipídios encontram-se associados à cutina, constituindo a cutícula vegetal que recobre a superfície dos órgãos aéreos das plantas vasculares e algumas briófitas (JEFFREE, 1996; HEREDIA, 2003). As ceras cuticulares integradas à cutina são denominadas intracuticulares e as depositadas mais superficialmente, ceras epicuticulares (BARGEL *et al.*, 2006).

Sobre a cera epicuticular é comum a presença de cristais de cera em forma de filamentos, bastões, plaquetas, tubos, estruturas amorfas e dendríticas (JEFFREE, 1986; BARTHLOTT *et al.*, 1998). Considerando o aspecto químico, as ceras cuticulares são misturas complexas de substâncias alifáticas de cadeias longas, principalmente *n*-alcanos, ácidos graxos, alcoóis, cetonas, aldeídos e ésteres e de estruturas cíclicas, como triterpenóides e flavonóides (SHEPHERD *et al.*, 1995). Segundo Jetter e Riederer (1995), o componente químico predominante, influencia na morfologia dos cristais de cera e determina a aparência da superfície cuticular.

Diversos taxa têm sido caracterizados em função do perfil químico e micromorfológico de suas ceras, o que pode ser valioso para o agrupamento das plantas em uma categoria sistemática (BARTHLOTT, 1988; BARTHLOTT *et al.*, 2003; KOCH, 2009). No entanto, a utilização da composição química e/ou da micromorfologia como único parâmetro não é recomendada, uma vez que cristais semelhantes podem ser originados a partir de diferentes compostos químicos (JETTER, 2006). Além disso, variações no padrão químico e morfológico das ceras podem ocorrer de acordo com uma série de fatores endógenos e exógenos (FOSTER e HARRIS, 1992; EIGENBRODE, 1996; JEFFREE, 1996; EIGENBRODE e JETTER, 2002; FELDHAAR *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FEDERLE e RHEINDT, 2005; MÜLLER e RIEDERER, 2005). Contudo, vários estudos quimiotaxonômicos utilizando as propriedades químicas e micromorfológicas das ceras epicuticulares têm sido conduzidos para diversos grupos de plantas visando elucidar problemas taxonômicos.

Entre os compostos presentes nas ceras epicuticulares, os *n*-alcanos têm sido os mais utilizados para fins taxonômicos. Dove e Mayes (1991) referem-se aos *n*-alcanos como a “impressão digital”, uma vez que, supostamente, cada planta possui um perfil único desses hidrocarbonetos, podendo, desta forma, caracterizar um determinado grupo taxonômico.

Vários estudos apontam esses compostos como potenciais marcadores, por exemplo, Stevens *et al.* (1994), analisando espécies de *Sedum*, *Aeonium* e *Sempervivoideae* (Crassulaceae), apontam valor sistemático significativo dos perfis de alcanos e triterpenos das ceras, inclusive em níveis infra-genéricos, com base nos padrões de hibridização e caracteres morfológicos afins.

Maffei (1996) sugere a utilização quimiotaxonômica dos *n*-alcanos como marcadores, com base no estudo de ceras foliares de 96 espécies pertencentes a cinco subfamílias de gramíneas, que apontou correlações sistemáticas com dados morfológicos em nível de tribo e subfamília. Rommerskirchen *et al.* (2006), estudando gramíneas do subtipo C4, que prosperam em áreas tropicais e subtropicais extremamente áridas e que apresentam altas quantidades relativas de *n*-alcanos, concluíram que a classificação química ao nível de subfamília, está de acordo com o relatado previamente para a filogenia subfamiliar do grupo, indicando uma adaptação evolutiva das ceras de gramíneas C4 para regiões quentes e áridas. A presença majoritária de nonacosano (C29) e untriacontano (C31) em ceras de 11 espécies de *Pilocarpus* (Rutaceae) determinou a formação de dois grandes grupos por análise de agrupamento, além de um terceiro grupo próximo, formado por uma única espécie (SKORUPA *et al.*, 1998).

A diferenciação de grupos de espécies de *Clusia* foi possível de acordo com a proporção de *n*-alcanos e a presença de triterpenos específicos das ceras epicuticulares, mostrando a importância taxonômica dessas classes para a separação de espécies ou seções infragenéricas (MEDINA *et al.*, 2004; 2006). Motta *et al.* (2009) sugerem que o padrão de distribuição dos *n*-alcanos pode estabelecer relações intraespecíficas no gênero *Camarea* (Malpighiaceae), sendo porém, insuficiente para distinguir gêneros.

Estudos utilizando padrões de *n*-alcanos para fins quimiotaxonômicos foram conduzidos, ainda, em diferentes grupos de plantas, como Melastomataceae, Leguminosae, Moraceae, Solanaceae (MIMURA *et al.*, 1998; MERINO *et al.*, 1999; MUBO *et al.*, 2005; MOHY-UD-DIN *et al.*, 2010), entre outros, indicando a importância dessa classe de compostos para a quimiosistemática. Por outro lado, nem sempre o perfil dos alcanos é suficiente para agrupar ou separar espécies de determinados taxa. Por exemplo, comparações entre espécies de *Huberia* mostraram variações intraespecíficas substanciais nos padrões de *n*-alcanos, podendo essa classe não representar um bom caráter taxonômico ao nível de espécie, além de levantar

dúvidas quanto à utilidade das distribuições de alcanos em níveis hierárquicos mais elevados (MIMURA *et al.*, 1998).

O amplo espectro de compostos secundários juntamente com a biologia molecular é fortemente ressaltado como ferramentas indispensáveis à interpretação das relações evolutivas entre subfamílias de Euphorbiaceae (ESSER, 1997; DAVIS *et al.*, 2007). Manners e Davis, 1986, utilizando dados químicos de ceras para classificação intra-específica de *Euphorbia* spp. da América do Norte e Áustria, observaram similaridade qualitativa geral, permitindo o agrupamento de espécies. De acordo com Grayer *et al.* (1999), árvores moleculares baseadas em DNA *rbcl* parecem úteis em estudos comparativos de classes de compostos secundários como ferramenta quimiotaxonômica. Por outro lado compostos químicos podem ser usados como apoio adicional para árvores moleculares.

Métodos utilizando DNA nuclear ribossomal (nrRNA) e sequência de espaçadores moleculares internos (ITS), do fragmento *trnL-F* e DNA plastidial, entre outros métodos moleculares, foram empregados em algumas espécies de *Euphorbia*, *Croton*, *Macaranga*, *Jatropha* (WURDACK *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 2005; KULJU *et al.*, 2007; PAMIDIMARRI *et al.*, 2008). Contudo, apesar da comprovada eficácia quimiotaxonômica das ceras epicuticulares e da importância da família Euphorbiaceae nos trópicos, sobretudo em regiões semi-áridas como a Caatinga, não há, até a presente data, nenhum registro de análises químicas das ceras epicuticulares para as espécies do presente estudo, bem como sobre a utilização dos constituintes das ceras como possíveis marcadores taxonômicos.

2.3. Micromorfologia das ceras epicuticulares vegetais

Nas últimas décadas, a microestrutura da superfície cuticular tem sido alvo de diversos estudos, apoiados por diferentes técnicas como a microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, mais recentemente, a microscopia de força atômica (MFA), que permite melhor entender a formação e regeneração dos cristais de cera na superfície cuticular, ao nível molecular (KOCH *et al.*, 2004). MORRIS *et al.* (1999) destacam a importância desta técnica pela capacidade de análise de uma grande variedade de amostras sob diferentes condições, permitindo uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos na dinâmica dos processos de

formação dos cristais de cera, inclusive em ambientes naturais (BECKER e GASHAROVA, 2001).

Assim como a composição química, a aparência da superfície cuticular é amplamente diversificada, apresentando comumente uma camada contínua em forma de filme, imediatamente sobreposta à cutina, podendo sobre esta, ocorrer várias formações como filmes lisos, placas, crostas, cristalóides solitários, escamas, flocos, filamentos, bastões, plaquetas perpendiculares, túbulos, varetas, estruturas dendríticas ou amorfas (KOLATTUKUDY, 1980; JEFFREE, 1986; BARTHLOTT *et al.*, 1998; JEFFREE, 2006). A morfologia tridimensional dos cristais de cera epicuticular é de particular importância para a maioria das interações interfaciais entre a planta e o ambiente (KOCH, 2006).

A terminologia comumente utilizada na classificação morfológica das ceras está baseada em Barthlott *et al.* (1998) e Jeffre (2006). Os primeiros autores classificam as ceras em 23 diferentes tipos, com base em caracteres químicos e morfológicos, enquanto Jeffre (2006) classifica as ceras em seis tipos e sugere a divisão em sub-tipos morfológicos e químicos. Em muitos casos, a morfologia desses cristais é determinada pelo componente químico predominante na cera, determinando a aparência da superfície cuticular. No entanto, compostos com menores concentrações podem influenciar na morfologia dos cristais (JEFFREE *et al.*, 1975).

Estudos diversos sobre a morfologia e a química das ceras cuticulares, têm revelado diversidade de padrões, em função da ontogenia, composição química e circunstâncias ambientais (FOSTER e HARRIS, 1992; EIGENBRODE, 1996; JEFFREE, 1996; CHAPMAN, 1977; PARR *et al.*, 1998; EIGENBRODE e JETTER, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FELDHAAR *et al.*, 2003; FEDERLE e RHEINDT, 2005; MÜLLER e RIEDERER, 2005). É comum um determinado padrão morfológico caracterizar um determinado táxon, o que pode ser valioso para a sistemática vegetal (BARTHLOTT, 1988; BARTHLOTT *et al.*, 2003; KOCH, 2008).

Porém, a utilização da micromorfologia como único parâmetro não é recomendada, uma vez que cristais semelhantes podem ser originados a partir de diferentes compostos químicos (JETTER, 2006). Um exemplo comum é o cristal de cera tipo plaqueta, que apresenta uma alta variabilidade morfológica e química. As plaquetas de cera de algumas espécies de *Triticum* e de *Eucalyptus* são dominadas por alcoóis primários, ao mesmo tempo é relatada a presença majoritária de aldeídos em

plaquetas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (JEFFREE *et al.*, 1975;. HAAS *et al.*, 2001), e arroz (*Oryza sativa* L.) (HAAS *et al.*, 2001). Também foi observada a formação de plaquetas em folhas de *Nepenthes ventrata* e *N. alata* (RIEDEL *et al.*, 2003; GAUME *et al.*, 2004; GORB *et al.*, 2005).

Riedel *et al.* (2003) chamam atenção para a semelhança de polaridade e geometria molecular entre compostos de classes diferentes que induzem a mesma formação morfológica dos cristais, como é o caso do aldeído C30 e do álcool C30 que ocorrem em concentrações semelhantes em *Nepenthes alata*, sugerindo que os cristais podem ser formado por álcoois, aldeídos, ou talvez pelo sinergismo entre ambas as classes de compostos. Além dessas classes há relatos de plaquetas associadas à cetonas em *Allium porrum* e alguns espécies de *Euphorbia* (JEFFREE *et al.*, 1975; BAKER, 1982; KOCH *et al.*, 2006). Segundo Koch *et al.* (2009), as plaquetas podem ser dominadas também por alcanos, aldeídos, ésteres, álcoois secundários ou flavonóides.

Outro exemplo bem documentado é a formação de cristais tubulares associados aos álcoois secundários. Por exemplo, Wen *et al.* (2006) reportam uma relação direta da formação de cristais tubulares nas ceras epicuticulares com os altos percentuais de nonacosano-4,10-diol e nonacosano-5,10-diol na superfície abaxial, e nonacosan-10-ol na superfície adaxial foliar de *Taxus baccata*. Além desses compostos, foram encontradas grandes quantidades de ácidos graxos e menores porcentagens de aldeídos, álcoois primários, ésteres de alquila e alcanos. Resultados semelhantes foram obtidos por Dragota e Riederer (2007), os quais observaram a formação de cristais tubulares na cera epicuticular foliar de *Wollemia nobilis* (Araucariaceae) associada à presença do nonacosan-10-ol como o constituinte majoritário nessa espécie.

Variados padrões morfológicos de ceras foram observados em diferentes taxa. Monqueiro *et al.* (2004), estudando a resistência da superfície cuticular de plantas daninhas à penetração de herbicidas, verificaram, em algumas plantas, o predomínio dos *n*-alcanos formando um filme de cera, enquanto que em outras, foi observada a presença majoritária de alcoóis e ésteres, determinando a formação de grânulos e cristais amorfos. Bleckmann e Hull (1975) encontraram padrão morfológico tipo-placa em espécies de algaroba (*Prosopis* spp.) de diferentes regiões do hemisfério sul, enquanto Kim (2008) observou a ocorrência de grânulos e plaquetas em ceras de *Ficus elastica*. Para Jeffre (2006), ceras com altas concentrações de *n*-alcanos geralmente têm aparência amorfa.

O incremento na produção de cera cuticular total como estratégia adaptativa em plantas submetidas a situações de estresse, foi reportada em diferentes estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007; KOSMA *et al.*, 2009). Todavia, alterações morfológicas nos cristais parecem não estar diretamente relacionadas com o aumento na concentração de cera, como demonstraram experimentos conduzidos por Cameron *et al.* (2006). Koch *et al.* (2006) estudaram os efeitos da umidade relativa sobre *Brassica oleracea* (Brassicaceae), *Eucalyptus gunnii majus* (Myrtaceae) e *Tropaeolum* (Tropaeolaceae) e registraram pouca influência dessa variável sobre a morfologia das ceras epicuticulares nessas espécies.

Por outro lado, Xu *et al.* (2009) verificaram alterações na morfologia, no teor total de cera, além da maior concentração de compostos de cadeias longas, em função do envelhecimento das folhas e do estresse hídrico no musgo *Syntrichia caninervis*. Com base nos resultados, os autores sugerem o uso das ceras epicuticulares como biomonitores ambientais. Variação temporal dos componentes cuticulares havia sido detectada por Jetter e Schäffer (2001), os quais registraram um aumento de até seis vezes na biossíntese de cera em *Prunus laurocerasus* no intervalo de 57 dias. Esses resultados diferem dos obtidos por Riederer e Markstädter (1996), que verificaram maior síntese de compostos de cadeias mais longas em folhas mais jovens de *Ficus elastica*.

Apesar da representatividade da família Euphorbiaceae, estudos sobre a ultraestrutura das ceras cuticulares de suas espécies ainda são escassos e restritos, basicamente, aos gêneros *Jatropha*, *Macaranga*, *Ricinus* e *Euphorbia* (OLOWOKUDEJO, 1993; FEDERLE *et al.*, 1997; MARKSTÄDTER *et al.*, 2000; GUHLING *et al.*, 2005; GUHLING *et al.*, 2006).

Recentemente, Kulshreshtha e Ahmed (2008), estudando a micromorfologia das ceras de 16 espécies em 13 gêneros de Euphorbiaceae, identificaram variados tipos morfológicos (grânulos, placas, cristais em forma de fita, haste, crosta, cristais agregados), predominando grânulos finos e placas cristalóides, porém em várias espécies a cera se apresentou escassa ou imperceptível. A variabilidade nos padrões morfológicos das ceras epicuticulares entre as diversas espécies estudadas parece ser determinada mais pela composição química do que por fatores ambientais.

2.4. Ceras epicuticulares e interações com insetos

A cutícula atua como substrato para diferentes interações com a fauna insetívora, e as diversas estruturas como tricomas glandulares, tectores e cristais de ceras com diferentes formas, tamanhos e composição química, podem ser determinantes na interação inseto-planta (RIEDERER, 2006). Por outro lado, os insetos apresentam uma diversidade de formas em seus tarsos permitindo-lhes mover-se e fixar-se eficazmente à superfície da planta, onde podem copular, ovipositar, forragear, etc. (EIGENBROD, 2004)

Estudos têm revelado que as interações inseto-planta podem ser influenciadas pela composição química e/ou morfologia das ceras. No entanto, os efeitos das ceras epicuticulares sobre os insetos são mais comportamentais do que tóxicos ou nutricionais (EIGENBROD e SPELIE, 1995). Estudos correlacionando ceras epicuticulares e interações com insetos são bem documentados. Por exemplo, já na década de 70, Bernays *et al.* (1976) relataram que gafanhotos podem distinguir entre plantas susceptíveis e não-susceptíveis ao ataque, através do simples contato dos seus quimiorreceptores com a superfície das ceras.

Foster e Harris (1992) observaram que a mistura de compostos da cera epicuticular do trigo, mostrou-se dez vezes mais atrativa para a oviposição de *Mayetiola destructor* (Diptera: Cecidomyiidae), quando comparada ao grupo controle. Morris *et al* (2000) identificaram em ceras de trigo, os aldeídos 1-octacosanal e 6-metoxi-2-benzoxazolinona como os principais componentes responsáveis por estimular a oviposição nessa espécie. Os autores observaram ainda um aumento do número de ovos postos, proporcional ao aumento da cadeia carbônica e da abundância do aldeído.

Eigenbrode e Jetter (2002), em bioensaios com genótipos de *Brassica oleraceae* com ceras de diferentes características, observaram a influência da composição química e da microestrutura das ceras no forrageamento do besouro *Hippodamia convergens*, sendo constatado, mais adiante, que as larvas dessa espécie evitam forragear por trilhas químicas deixadas por outras larvas, o que sugere uma maior interferência do fator químico em relação ao fenótipo da cera epicuticular, podendo ocorrer ainda uma combinação dos dois fatores (RUTLEDGE *et al.* 2008).

A atividade biológica dos compostos químicos das ceras é reportada em diversos trabalhos. Por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa (>16) afetam o comportamento

de insetos, geralmente estimulando a alimentação (CHAPMAN, 1977) ou a oviposição (PARR *et al.*, 1998). Yang *et al.* (1993) observaram que larvas de *Spodoptera frugiperda*, movem-se mais rapidamente em folhas de milho que apresentam maiores proporções de *n*-alcanos. Segundo Li e Ishikawa (2005), a mistura de *n*-alcanos e ácidos graxos livres em cera de folhas de *Fallopia japonica* (Polygonaceae) estimula naturalmente a oviposição de *Ostrinia latipennis* (Lepidoptera).

A importância do fenótipo da superfície cuticular tem sido relatada em diversos estudos, como demonstrado por Gorb e Gorb (2002), que observaram a dificuldade de adesão do coleóptero *Chrysolina fastuosa* em superfícies ricas em cristais de cera e pêlo, enquanto Alfaro-Tapia *et al.* (2007) verificaram que a microestrutura das ceras epicuticulares em híbridos de *Populus* spp. resistentes e suscetíveis ao ataque do pulgão *Chaitophorus leucomela*, afetou o desempenho do inseto, não interferindo, no entanto, na oviposição.

Recentemente, Bitar *et al.* (2010) através de bioensaios, testaram o poder de fixação de machos e fêmeas de *Cydia pomonella* (Lepdoptera) em superfícies cuticulares rugosas e lisas, constatando maior dificuldade de adesão e locomoção em superfícies rugosas, o que pode explicar o fato das fêmeas dessa espécie preferirem superfícies lisas para ovipositar. Estudando o mecanismo de adesão dos ovos de insetos sobre a superfície cuticular, Voigt e Gorb (2010) concluíram que secreções ricas em proteínas, liberadas juntamente com os ovos, solidificam e promovem a fixação destes às ceras epicuticulares.

A conhecida relação entre as chamadas plantas insetívora (*Nepenthes*) e insetos foi bastante estudada, e os resultados demonstraram que ceras ricas em cristais dificultam a adesão e tornam a superfície escorregadia para os insetos, ressaltando a importância dos cristais de cera para o hábito da planta (RIEDEL *et al.*, 2003; GAUME *et al.*, 2004; GORB *et al* 2005).

Por outro lado, relações positivas podem ser mediadas pelas ceras epicuticulares, como pode ser observado no mimercofilismo entre espécies de *Macaranga* (Euphorbiaceae) e formigas, principalmente dos gêneros *Crematogaster* e *Camponotus*, que estabelecem entre si simbioses mutualísticas, onde a planta fornece substrato e recursos alimentares, enquanto as formigas inibem potenciais predadores (MARKSTADTER, 2000; FEDERLE e RHEINDT 2005; GUHLING *et al.*, 2005).

As ceras epicuticulares podem também exercer importantes funções na interação inseto galhador-planta hospedeira, atuando na proteção das galhas como filtro solar, como proteção mecânica ou servindo como repelente de outros herbívoros e parasitóides, com base na presença de substâncias como terpenos e flavonóides (SCARELLI-SANTOS e VARANDA, 2007).

No Brasil, a maior parte dos estudos sobre insetos galhadores tem se concentrado no cerrado (GONÇALVES-ALVIM e FERNANDES, 2001; URSO-GUIMARÃES *et al.*, 2003; GUIMARÃES e SCARELLI-SANTOS, 2006). O PARNA do Catimbau possui vegetação típica, formando um mosaico com diferentes tipos vegetacionais e floras características, predominando a vegetação de Caatinga (SILVA *et al.*, 2009). Nesse ambiente, Euphorbiaceae é bem representada, necessitando, porém de mais estudos sobre a fauna insetívora indutora de galhas associada à família.

Investigações sobre ocorrência de galhas em Euphorbiaceae foram realizadas em poucas espécies como, *Colliguaja* spp. (FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 1999; GONZÁLES *et al.*, 2005), *Euphorbia* spp. (GAGNE, 1990; SHORTHOUSE e GASSMANN, 1994; NELSON e CARLSON, 1999), *Sebastiania glandulosa* (MAIA e OLIVEIRA, 2007), o que sugere a necessidade de mais estudos com essa complexa família, sobretudo em ambiente de Caatinga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, W.; NAZIR, M.; CHAUDHARY, F. M.; AHMAD, A. (1996). Hydrocarbon distribution in epicuticular waxes of five *Euphorbia* species. **Zeitschrift Fur Naturforschung C 51**: 291-295.
- ALFARO-TAPIA, A.; VERDUGO, J. A.; ASTUDILO, L. A.; RAMIREZ, C. C. (2007). Effect of epicuticular waxes of poplar hybrids on the aphid *Chaitophorus leucomelas* (Hemiptera : Aphididae). **131**: 486-492.
- BECKER, U.; GASHAROVA, B. (2001). AFM observations and simulations of jarosite growth at the molecular scale: probing the basis for the incorporation of foreign ions into jarosite as a storage mineral. **Physics and Chemistry of Minerals 28**: 545-556.
- BERNAYS, E.A.; BLANEY, W.M.; CHAPMAN, R.F.; COOK, A.G. (1976). The ability of *Locusta migratoria* L. to perceive plant surface waxes. T Jermy (ed.). In **The Host Plant in Relation to bisect Behaviour and Reproduction**, pp.35-40. New York: Plenum.
- BARBOSA, M. R. V. et al. (1996). Cheklist preliminar das Angiospermas. SAMPAIO, E.V.S.B.; MAYO, S.J. e BARBOSA, M.R.V. (eds.). In: **Pesquisa Botânica nordestina: progresso e perspectivas**. SBB, Recife. pp.253-414.
- BAKER, E.A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. D.F. Cutler, K.L. Alvin & C.E. Price (eds.). In: **The Plant Cuticle**, Linnean Society Symposium Series v. 10, p. 139-165. Academic Press, London.
- BALSDON, J.A.; ESPELIE, K.E.; BRAMAN, S.K. (1995). Cuticular lipids from azalea (*Rhododendron* spp.) and their potential role in host plant acceptance by azalea lace bug, *Stephanitis pyrioides* (Scott). **Biochemical Systematics and Ecology 23**: 477-481
- BARGEL, H.; KOCH, K.; CERMAN, Z. (2006). Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? **Functional Plant Biology 33**: 893-910.
- BARTHLOTT, F.D.W. Mikromorphologie der epicuticularen Wachse und das System der Monokotylen (1988). **Tropische und subtropische flandenwelt. 63**: 279- 409.

- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 126, p. 237-260.
- BARTHLOTT, W.; THEISEN, I.; BORSCH, T.; NEINHUIS, C. (2003). Epicuticular waxes and vascular plant systematics: integrating micromorphological and chemical data. In: Stuessy, T.F.; Mayer, V.; Horandl, E (eds.). **Deep morphology: toward a renaissance of morphology in plant systematics**. A. R. G. Gantner Verlag: Ruggell, pp.189-206.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. (1984). **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. II. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. 377p.
- BECKER, U.; GASHAROVA, B. (2001). AFM observations and simulations of jarosite growth at the molecular scale: probing the basis for the incorporation of foreign ions into jarosite as a storage mineral. **Physics and Chemistry of Minerals** **28**: 545–556
- BERRY, P.; HIPPI, KENNETH, A. J.; WURDACK; VAN, B.; RIINA, R. (2005). Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe crotonaeae (Euphorbiaceae Sensu stricto) using trnL-trnF DNA. **American Journal of Botany** **92**: 1520-1534.
- BLECKMANN, C. A.; HULL, H. M. (1975). Leaf and cotyledon surface ultrastructure of five *Prosopis*. **Journal of the Arizona Academy of Science** **10**: 98-105.
- BONDADA, B. R.; OOSTERHUIS, D. M.; MURPHY, J. B.; KIM, K. S. (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. **Environmental and Experimental Botany** **36**: 61-69.
- BUSCHHAUS, C.; HERZ, H.; JETTER, R. (2007). Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist**, 176: 311-316.
- BRUCE, D. M.; STEPHEN, P. F.; HARRIS, M. O. (2000). Identification of 1-octacosanal and 6-methoxy-2-benzoxazolinone from wheat as ovipositional

- stimulants for hessian fly, *Mayetiola destructor*. **Journal of Chemical Ecology** **26**: 859-873.
- CLAIRE, E.; RUTLEDGE, S.; EIGENBRODE, D.; HONGJIAN, D. (2008). A plant surface mutation mediates predator interference among ladybird larvae. **Ecological Entomology** **33**: 464-472.
- CAMERON, K. D.; MOSKAL, W. A.; SMART, L. B. (2006). A second member of the *Nicotiana glauca* lipid transfer protein gene family, NgLTP2, encodes a divergent and differentially expressed protein. **Funct Plant Biol.** **33**: 141-152.
- CHANG, G. C.; NEUFELD, J.; DURR, D.; DUETTING, P. S.; EIGENBRODE, S. D. (2004). Waxy bloom in peas influences the performance and behavior of *Aphidius ervi*, a parasitoid of the pea aphid. **The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata** **110**: 257-265.
- CHAPMAN, R. F.; SWORD, G. (1993) The importance of palpation in food selection by a polyphagous *Grasshopper* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Insect Behaviour** **6**: 79-91.
- CRONQUIST, A. (1981). **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden. Columbia University Press. 1262p.
- DAOUST, S. P.; MADER, B. J; BAUCE, E.; DESPLAND, E.; DUSSUTOIR, A.; ALBERT, P. J. (2010). Influence of epicuticular-wax composition on the feeding pattern of a phytophagous insect: implications for host resistance. **Can. Entomol.** **142**: 261-270.
- DAVIS, C.; CHARLIS; MARIBETH LATVIS; DANIEL, L.; NICKRENT; KENNETH, J.; WURDACK; DAVID, A.; BAUM. (2007). Floral gigantism in *Rafflesiaceae*. **Science** **315**: 1812.
- DODD, R.S. and AFZAL-RAFII, Z. 2000. Habitat-related adaptive properties of plant cuticular lipids. **Evolution** **54**:1438-1444.
- DODD, R. S. and POVEDA, M. M. 2003. Environmental gradients and population divergence contribute to variation in cuticular wax composition in *Juniperus communis*. **Biochemical Systematics and Ecology** **31**: 1257-1270.

- DOVE, H.; MAYES, R.W. (1991). The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Aust. J. Agric. Res.*, **42**: 913-952.
- DRAGOTA, S.; RIEDERER, M. (2007). Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: morphology and chemical composition. *Annals of Botany* **100**: 225-231.
- EIGENBRODE, S. D. (1996). Plant surface waxes and insect behaviour. In: Kerstiens G (ed) **Plant cuticles: an intergrated functional approach**. Bios Press, Oxford, p. 201-222.
- EIGENBRODE, S.D., ESPELIE, K.E. (1995). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Reviews Entomology.*, **40**: 171-194.
- EIGENBRODE, S.D.; JETTER, R. (2002). Attachment to plant surface waxes by an insect predator. *Integr.Comp.Biol.*, **42**: 1091–1099.
- EIGENBRODE, S.D. (2004). The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and effectiveness of predatory insects. *Arthropod Structure & Development.*, **33**: 91-102.
- ESCALANTE-EROSA, F.; ORTEGÓN-CAMPOS, I.; PARRA-TABLA, V.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. (2004). Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **48**: 24-25.
- ESSER, H.J.; VAN WELZEN, P.; DJARWANINGSIH, T. (1997). A phylogenetic classification of the Malesian Hippomaneae (Euphorbiaceae). *Systematic Botany* **22**: 617-628.
- FAINI, F.; LABBE, C.; COLL, J. (1999). Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**: 673-679.
- FEDERLE, W.; MASCHWITZ, U.; FIALA, B.; RIEDERER, M.; HOLDOBLER, B. (1997). Slippery Ant & plants and Skiful climbers: Selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Oecologia* **112**: 217-224.
- FEDERLE, W.; RHEINDT, F. E. (2005). *Macaranga* ant-plants hide food from intruders: correlation of food presentation and presence of wax barriers analysed

using phylogenetically independent contrasts. **Biological Journal of the Linnean Society** **84**: 177-193.

FELDHAAR, H.; FIALA, B.; GADAU, J.; MOHAMED, M.; MASCHWITZ, U. (2003). Molecular phylogeny of *Crematogaster* subgenus *decacrema* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Macaranga* (Euphorbiaceae) trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **27**: 441-452.

FERNANDES, G. W. (1994). Plant mechanical defenses against insect herbivory. **Revista Brasileira de Entomologia** **38**: 421-433.

FERNANDENS, G.W.; DE PAULA, A.S. & LOYOLA JR., R. (1995). Distribuição deferencial de insetos galhadores entre habitats e seu possível uso como bioindicadores. **Vida Silvestre Neotropical** **4**: 133-139.

FICKE, A.; GADOORY, D. M.; GODFREY, D.; DRY, I. B. (2004). Host barriers and responses to *Uncinula necator* in developing grape berries. **Phytopathology** **94**: 438-445.

FOSTER, S. P.; HARRIS, M. O. (1992). Foliar chemicals of wheat and related grasses influencing oviposition by Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). **Journal of Chemical Ecology** **18**: 1965-1980.

FUKUDA, S.; SATOH, A.; KASAHARA, H.; MATSUYAMA, H.; TAKEUCHI Y. (2008). Effects of ultraviolet-B irradiation on the cuticular wax of cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. **J Plant Res.**, **121**: 179-189.

FUENTES-CONTRERAS, E.; GIANOLI E.; CABALLERO P. P.; NIEMEYER H. M. (1999). Influence of altitude and host-plant species on gall distribution in *Colliguaja* spp. (Euphorbiaceae) in central Chile. **Revista Chilena De Historia Natural** **72**: 305-313.

GAGNÉ, R.J. (1990). Gall Midge Complex (Diptera: Cecidomyiidae) in Bud Galls of Palearctic *Euphorbia* (Euphorbiaceae). **Annals of the Entomological Society of America** **83**: 335-345.

GAUME, L.; PERRET, P.; GORBC, E.; GORBC, S.; LABAT, J. J.; ROWEA, N. (2004). How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based

- trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. **Arthropod Structure & Development**. **33**: 103-111.
- GENTRY, G.L.; BARBOSA, P. (2006). Effects of leaf epicuticular wax on the movement, foraging behavior, and attack efficacy of *Diaeretiella rapae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. **121**: 115–122.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. (2000). **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Royal Botanical Gardens. 420p.
- GNIWOTTA, F.G.; VOGG, V.; GARTMANN, T.L.W.; CARVER, M.; RIEDERER, M.; JETTER, R. (2005). What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. **Plant Physiol.**, **139**: 519-530.
- GONZALES W.L.; CABALLERO P.P.; MEDEL, R. (2005). Galler-induced reduction of shoot growth and fruit production in the shrub *Colliguaja integerrima* (Euphorbiaceae). **Revista Chilena de Historia Natural** **78**: 393-399.
- GORB, E.V.; GORB, S.N. (2002). Attachment ability of the beetle *Chrysolina fastuosa* on various plant surfaces. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **105**: 13-28.
- GORB, E.; HAAS, K.; HENRICH, A.; ENDERS, S.; BARBAKADZE, N.; GORB, S. (2005). Composite structure of the crystalline epicuticular wax layer of the slippery zone in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* and its effect on insect attachment. **The Journal of Experimental Biology** **208**: 4651-4662.
- GORDON, D.C.; PERCY, K.E.; RIDING, R.T. (1998). Effects of u.v.-B radiation on epicuticular wax production and chemical composition of four *Picea* species. **New Phytologist** **138**: 441-449.
- GRAYER, R.J.; CHASE, M.W.; SIMMONDS, M.S.J. (1999). A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". **Biochemical Systematics and Ecology** **27**: 369-393.
- GUHLING, O; KINZLER, C.; DREYER, M.; BRINGMANN, G.; JETTER, R. (2005). Surface composition of myrmecophilic plants: Cuticular wax and glandular

- trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2325-2343.
- GUHLING, O.; HOBL, B.; YEATS, T.; JETTER, R. (2006). Cloning and characterization of a lupeol Synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. **Arch Biochem Biophys.**, **448**: 60-72.
- GÜLZ, P.G.; MÜLLER, E.; PRASAD, R.B.N. (1991). Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves **Phytochemistry** **30**: 769-773.
- GÜLZ, P.G.; MÜLLER, E.; SCHMITZ, K.; MARNER, F.J.; GÜTH, S. (1992). Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. **Zeitschrift für Naturforschung**, **47**: 516-526.
- HAAS, K. (1991). Components with unusual long chains in the epicuticular wax of *Kalanchoe scapigera*. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**. p.372-531.
- HEREDIA, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta** **1620**: 1-7.
- HOLLOWAY, P.J. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. DF Cutler, KL Alvin, C. E. Price (eds.). In: **The Plant Cuticle**, Linnean Society Symposium Series, Vol 10. Academic Press, London. pp.1-32.
- JEFFREE, C.E.; BAKER, E.A.; HOLLOWAY, P.J. (1975). Ultrastructure and recrystallisation of plant epicuticular waxes. **New Phytologist** **75**: 539-549.
- JEFFREE, C.E. (1986). The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: Juniper B, Southwood R, eds. **Insects and the plant surface**. London, UK: E. Arnold, 23–135.
- JEFFREE, C.E. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens, G., ed, **Plant Cuticles**. **Bio Scientific Publishers**, Oxford. pp 33-82.
- JEFFREE, C.E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.). In **Biology of the Plant Cuticle**. Blackwell, Oxford. pp.11-144.

- JENKS, M.A.; TUTTLE, H.A.; EIGENBRODE, S.D.; FELDMANN, K.A. (1995). Leaf epicuticular waxes of the eceriferum mutants in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, **108**: 369-377.
- JENKS, M.A., EIGENBRODE, S., BERTRAND, D. (2002). Cuticular waxes of *Arabidopsis*. Somerville, C., Meyerowitz, E. (eds). In: **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA. pp.156-169.
- JETTER, R., RIEDERER, M. (1995). In vitro reconstitution of epicuticular wax crystals -formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols, **Botanica Acta** **108**: 111-120.
- JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A.L. (2006). Composition of plant cuticular waxes In: Riederer, M.; Müller, C. eds. Biology of the plant cuticle. **Oxford, UK: Blackwell**. p. 182–215.
- JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A.L. (2007). Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), Biology of the Plant Cuticle. **Blackwell, Oxford**, p. 1450-181.
- JETTER, R.; SCHÄFFER, S.; RIEDERER, M. (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. **Plant Cell Environ.**, **23**: 619-628.
- JETTER, R.; SCHÄFFER, S. (2001) Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. **Plant Physiology** **126**: 1-13.
- KOLATTUKUDY, P. E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses, in Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach (ed. G. Kerstiens), **BIOS Scientific Publishers Ltd.**, Oxford, pp. 83-108.
- KERSTIENS, G. (1996) Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure–function relationships. **Trends in Plant Science** **1**: 125-129.
- KIM, K.W.; WEN, M.; BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. (2006). Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. **Phytochemistry** **67**: 1808-1817.

- KIM K.S., PARK, S.H., JENKS, M.A. (2007a). Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. **J. Plant Physiol**, **164**: 1134-1143.
- KIM K.S., PARK, S. H., KIM, D.K., JENKS, M.A. (2007b). Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* L.). **Int. J. Plant Sci.** **168**: 307-316.
- KIM, K.W. (2008). Visualization of micromorphology of leaf epicuticular waxes of the rubber tree *Ficus elastica* by electron microscopy. **Micron** **39**: 976-984.
- KUNST, L., SAMUELS, A.L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in Lipid Research** **42**: 51-80.
- KOCH, K.; NEINHUIS, C.; ENSIKAT, H.È.; BARTHLOTT, W. (2004). Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM) **Journal of Experimental Botany** **55**: 711-718.
- KOCH, K.; BHUSHAN, B.; BARTHLOTT, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. **Science** **54**: 137-178.
- KOCH, K.; ENSIKAT, H. (2008). Visualization of micromorphology of leaf epicuticular waxes of the rubber tree *Ficus elastica* by electron microscopy. **Micron**. **39**: 976-984.
- KOCH, K.; HARTMANN, K. D.; SCHREIBER, L.; BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. (2006). Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. **Environmental and Experimental Botany** **56**: 1-9.
- KOLATTUKUDY, P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. **Science**, **208**: 990-1000.
- KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.S.; FLAISHMAN, M. A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. **National Academy of Sciences of the United States of America**. **92**: 480-487.
- KOSMA, D.K.; BOURDENX, B.; BERNARD, A.; PARSONS, E.P.; LÜ, S.; JOUBÈS, J.; JENKS, M.A. (2009). The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. **Plant Physiology** **151**: 1918-1929.

- KULJU, K.K.M.; SIERRA, S.E.C.; VAN WELZEN, P.C. (2007). Re-shaping Mallotus [part 2]: inclusion of *Neotrewia*, *Octospermum* and *Trewia* in Mallotus s.s. (Euphorbiaceae s.s.). **Blumea**, **52**: 115-136.
- KULSHRESHTHA, K.; AHMED, K.J. (2008). SEM studies of foliar epicuticular wax morphology in some taxa of Euphorbiaceae. **Feddes Repertorium** **104**: 361-370.
- LI, G.E.; ISHIKAWA, Y. (2006). Leaf epicuticular wax chemicals of the japanese knotweed *Fallopia japonica* as oviposition stimulants for *Ostrinia latipennis*. **Journal of Chemical Ecology** **32**: 595-604.
- LUCENA, M.F.A. Diversidade de Euphorbiaceae (s. l.) no Nordeste do Brasil. Tese (Doutorado). **Universidade Federal de Pernambuco**. 2009.
- MAARSEVEEN, C.V.; JETTER, R. (2009). Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. **Phytochemistry** **70**: 899-906.
- MAFFEI, M. (1996). Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. **Biochemical Systematics and Ecology** **24**: 53-64.
- MAIA, V.C.; OLIVEIRA, A. (2007). New species of Cecidomyiidae (Diptera) associated with *Sebastiania glandulosa* (Euphorbiaceae). **Iheringia, Sér. Zool.** **97**: 97-101.
- MAIA V.C.; FERNANDES, G W. (2004). Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia** **6**: 423 - 445.
- MANNERS, G.D.; DAVIS, D.G. (1984). Epicuticular wax constituents of North American and European Euphorbia esula biotypes. **Phytochemistry** **23**: 1059-1062.
- MANI, M.S. (1964). **Ecology of plant galls**. The Hague, Netherlands, Dr. W. Junk, 604p.
- MARKSTÄDTER, C.; FEDERLE, W.; JETTER, R.; RIEDERER, M.; HÖLLDOBLER, B. (2000). Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. **Chemoecology** **10**: 33-40.

- MEDINA, E.; AGUIAR, G.; GOMEZ, M.; ARANDA, J.; MEDINA, J. D.; WINTER, K. (2006). Taxonomic significance of the epicuticular wax composition in species of the genus *Clusia* from Panama. **Biochemical Systematics and Ecology** **34**: 319-326.
- MERINO, E. F.; MAESTRI, D.M. & PLANCHUELO, A.M. (1999). Chemotaxonomic evaluation of leaf alkanes in species of *Lupinus* (Leguminosae). **Biochemical Systematic and Ecology** **27**: 297-301.
- MEUSEL, I.; NEINHUIS, C.; MARKSTADTER, C.; BARTHLOTT, W. (2000). Chemical composition and recrystallization of epicuticular waxes: coiled rodlets and tubules. **Plant Biol.** **2**: 1-9.
- MIMURA, M.R.M., SALATINO, M.L.F., SALATINO, A., BAUMGRATZ, J.F.A. (1998). Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: Taxonomic implications **Biochemical Systematics and Ecology**. **26**: 581-588.
- MOHY-UD-DIN, A.; KHAN, Z.; AHMAD, M.; KASHMIRI M.A.; YASMIN, S.; ASGHAR, M.N.; AHMAD, S.R. (2010). Epicuticular waxes from *Solanum nigrum* Complex: Chemotaxonomic Implications. **Asian Journal of Chemistry** **22**: 2919-2927.
- MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. (2004). Caracterização da superfície foliar e das ceras Epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha** **22**: 203-210.
- MORRIS, V.J.; KIRBY, A.R.; GUNNING, A.P.A. (1999). Interfacial systems. In: **Atomic force microscopy for biologists**, p.160-208. London: Imperial College Press.
- MOTTA, L.B; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F. (2009). Foliar cuticular alkanes of *Camarea* (Malpighiaceae) and their taxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology** **37**: 35-39.
- MUBO, A.; SONIBARE, A.A.; JAYEOLAB, A.E.G. (2005). Chemotaxonomic significance of leaf alkanes in species of *Ficus* (Moraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** **33**: 79-86.

- MÜLLER, C. (2006). Plant–insect interactions on cuticular surfaces. In: Riederer, M.; Müller, C. (eds.). In: **Biology of the plant cuticle**. Oxford, UK: Blackwell. pp. 398–422.
- MÜLLER, C.; RIEDERER, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2621–2651.
- NELSON, J.A.; CARLSON, R.B. (1999). Observations on the biology of *Spurgia apitigena* brems on leafy Spurge in North Dakota. **Biological Control**. v.16, p.128–132.
- OLIVEIRA, A F.M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **75**: 431–439.
- OLOWOKUDEJO, J.D. (1993). Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **111**: 139–154.
- PAMIDIMARRI, D.V.N.S.; CHATTOPADHYAY, B.; REDDY M.P. (2009) Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Mol Biol Rep.**, **36**:1929–1935.
- PARR, M.J.; TRAN, B.M.D.; SIMMONDS, M.S.J.; KITE, G.C.; CREDLAND, P.F. (1998). Influence of some fatty acids on oviposition by the bruchid beetle, *Collosobruchus maculatus*. **J. Chem. Ecol.**, **24**: 1577–1593.
- PERCY, K.E.; MANKOVSKA, B.; HOPKIN, A.; CALLAN, B.; KARNOSKY, D.F. (2003). Ozone affects leaf surface–pest interactions. **Developments in Environmental Sciences** **3**: 247–258.
- PRICE, P.W. (1991). The plant vigor hypotheses and herbivore attack. **Oikos** **62**: 244–251.
- QUEIROZ, L.P. (2008). Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, **Royal Botanic Gardens Kew**, Associação plantas do Nordeste, 443 p. il.
- REED, D.W.; TUKEYR, H.B.J.R. (1982). Light intensity and temperature effects on epicuticular wax morphology and internal cuticle ultrastructure of carnation

- (*Dianthus caryophyllus*) and Brussels sprouts (*Brassica oleracea*) leaf cuticles. **J. Am. Hort. Soc.** **107**: 417-420.
- RIEDEL, M.; EICHNER, A.; JETTER, R. (2003). Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. **Planta**. v. 218, p.87–97.
- RIEDERER, R.; MULLER, C. (2006). **Biology of the plant cuticle**. Wiley-Blackwell. Annual Plant Reviews, Vol.23, 456p.
- RIEDERER, M., MARKSTÄDTER, C. (1996). Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge, in Plant Cuticles (ed. G. Kerstiens), **BIOS Scientific Publishers Ltd.**, Oxford, pp.189-200.
- ROMMERSKIRCHEN, F.; PLADER, A.A.; EGLINTON, G.; RULLKÖTTER, Y.; CHIKARAISHIC, J. (2006). Chemotaxonomic significance of distribution and stable carbon isotopic composition of long-chain alkanes and alkan-1-ols in C4 grass waxes. **Organic Geochemistry** **37**: 1303-1332.
- RUTLEDGE, C.E.; EIGENBRODE, S.D.; HONGJIAN, A. (2008). A plant surface mutation mediates predator interference among ladybird larvae. **Ecological Entomology** **33**: 464-472.
- SAMPAIO, E.V.S.B. (1995). Overview of the Brazilian Caatinga. In: Bullock SH, Mooney HA, Medina E. (ed.), **Seasonally dry tropical forest**, Cambridge:Cambridge University Press. pp.35-63.
- SANTOS J.C. ALMEIDA-CORTEZ J.S.; ALMEIDA, W.R.; FERNANDES, G.W. (2009). Diversity of gall-inducing insects of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço-MG.
- SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N.A. (2008). Família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **22**: 99-118.
- SCARELI-SANTOS, C.; VARANDA, E.M. (2007). Estudo Morfológico das Galhas Foliares de *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Biociência** **5**: 735-737.

- SHEPHERD, T.; ROBERTSON, G.W.; GRIFFITHS, D.W.; BIRCH, A.N.E.; DUNCAN, G. (1995) Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. **Phytochemistry** **40**: 407-417.
- SHELVEY, J.D.; KOZIO, M.J. (1986). Seasonal and SO₂-induced changes in epicuticular wax of ryegrass. **Phytochemistry** **25**: 415-420.
- SHORTHOUSE, J.D.; GASSMANN, A. (1994). Gall induction by *pegomya-curticornis* (stein) (diptera, anthomyiidae) within the roots of spurge *Euphorbia virgata* waldst and kit and estula (Euphorbiaceae). **The Canadian Entomologist** **126**: 193-197.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F. & CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**. v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.
- SIMPSON, M.G. (2006). **Plant systematics**. Academic Press, 608p.
- SKORUPA, L.A.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A. (1998). Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic Meaning. **Biochemical Systematics and Ecology** **26**: 655-662.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; CHASE, M.W. (2005) **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Sunderland, Massachusetts. pp.169-205.
- STEINMULLER, D.; TEVINI, M. (1985). Action of ultraviolet radiation (UVB) upon cuticular waxes in some crop plants. **Planta** **164**: 557-564.
- STEVENS, J.F.; HART, H.; BLOCK, A.; ZWAVING, J.H.; MALINGRE, T.M. (1994). Epicuticular wax composition of some European sedum species. **Phytochemistry** **35**: 389-399.
- URSO-GUIMARÃES, M.V.; SCARELI-SANTOS, C.; BONIFÁCIO-SILVA, A.C. (2003). Occurrence and characterization of entomogen galls in plants from natural vegetation areas in Delfinópolis, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** **63**: 705 -715.
- VERMEER, C.P.; NASTOLD, P.; JETTER, R. (2003). Homologous Very & long & chain 1,3 & alkanediols and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. **Phytochemistry** **62**: 433-438.

- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P.; AVATO, P.; MIKKELSEN, J.D. (1980). Light promotes synthesis of the very long fatty acyl chains in maize wax. In P Mazliak, P Benveniste, C Costes, R Douce, eds, **Biogenesis and Function of Plant Lipids**, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp.271-274.
- XU, S.J.; Liu, C.J.; Jiang, P.A.; Cai, W.M.; Wang, Y. (2009). The effects of drying following heat shock exposure of the desert moss *Syntrichia caninervis*. **Science of the Total Environment** **407**: 2411-2419.
- WALTON, T.J. (1990). Waxes, cutin and suberin. J. L. Harwood & J. Boyer (eds.). In: **Methods in Plant Biochemistry**. v. 4, Academic Press, London. pp.106-158.
- WEBSTER, G.L. (1994). Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **81**: 1-144.
- WEI, C.J.; HUA, H.J.; CHENG, X.S. (2008). Characteristics of seasonal variations of leaf *n*-alkanes and *n*-alkenes in modern higher plants. **Chinese Science Bulletin**. **53**: 2659-2664.
- WEN, M.; BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. (2006). Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. **Phytochemistry** **67**: 1808-1817.
- WURDACK, K.J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M.W. (2005). Molecular Phylogenetic Analysis of Uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *Sensu Stricto*) Using Plastid *RbcL* and *TrnL-F* Dna Sequences. **American Journal of Botany** **92**: 1397-1420.
- VOIGT, D.; GORB, S. (2010). Egg attachment of the asparagus beetle *Crioceris asparagi* to the crystalline waxy surface of *Asparagus officinalis*. **Proc. R. Soc. B**. **277**: 895-903.
- YANG, G.; ESPELIE, K.E.; WISEMAN, B.R. (1993). Effect of corn foliar cuticular lipids on the movement of fall armyworm larvae. **The Florida Entomol.**, **76**: 302-316.

**GALHAS EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE DO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO
(PARQUE NACIONAL VALE DO CATIMBAU - PE, BRASIL)**

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Arid Environments*

**GALHAS EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE DO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO
(PARQUE NACIONAL VALE DO CATIMBAU - PE, BRASIL)**

RESUMO

Galhas são crescimentos diferenciados do tecido vegetal induzidos por diferentes agentes como vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros e insetos, podendo ocorrer em diferentes órgãos da planta. Estudos sobre insetos indutores de galha e plantas hospedeiras tem se concentrado mais em vegetações de Cerrado e Restinga, sendo poucos os registros para o semiárido brasileiro. Assim, o presente estudo busca registrar a ocorrência de galhas em espécies de Euphorbiaceae no Parque Nacional do Catimbau, PE, Brasil. Três gêneros de Euphorbiaceae (*Croton*, *Cnidoscolus* e *Jatropha*), foram investigados quanto à presença e ausência de galhas, por um período de dois anos, com visitas periódicas em quatro áreas do Parque (Trilha Pedra da Concha, Trilha Pedra do Camelo, Trilha Pedra da Igrejinha e Casa de Farinha). No total foram amostrados 1.600 indivíduos e a presença de galhas foi registrada em média para 31% deles. As espécies de *Cnidoscolus* foram as mais atacadas por insetos galhadores, seguido das espécies de *Croton*. Por outro lado, não foi registrada a ocorrência de galhas nas espécies de *Jatropha* em nenhuma das áreas de estudo durante o período de observações. Entre as espécies de *Cnidoscolus*, *C. vitifolius* foi a mais galhada (71%), enquanto para as espécies de *Croton*, *C. adamantinus* apresentou maior abundância de galhas (56%). As variações na ocorrência de galhas entre as diferentes áreas e espécies indicam a necessidade de estudos complementares, levando-se em conta outras variáveis que podem interferir nos padrões de distribuição desses insetos.

Palavras-chave: Caatinga, herbivoria, interações, UPGMA

GALLS IN SPECIES OF EUPHORBIACEAE OF BRASILIAN SEMIARID

ABSTRACT

Galls are intumescences that can occur in distinct plant tissues and may be induced by different agents, such as virus, bacteria, fungi, nematodes, mites and insect. Studies on inducers and host plants have been focused on Cerrado and Restinga biomes, and little information about this is available in the semiarid. Therefore, this study aims on listing the occurrence of galls in species of Euphorbiaceae established at Catimbau National Park, State of Pernambuco, Brazil. For two successive years and in periodical field trips, this study investigated the occurrence of galls in three genera (*Croton*, *Cnidoscolus* and *Jatropha*) of the Euphorbiaceae family that are distributed over four different areas of the Park (Pedra da Concha trail, Pedra do Camelo trail, Pedra da Igrejinha trail and Casa de Farinha). Galls were found in about 31% of the 1.600 of them. Plants belonging to the *Cnidoscolus* genus were more affected by galls, being followed by *Croton* species. Differently, no galls were found in any of the *Jatropha* species sampled within the research areas along the duration of this study. Among *Cnidoscolus* species, *C. vitifolius* was intensely used as resource, with 71% of individuals galled, while for *Croton* species, *C. adamantinus* of 56% individuals were galled. The variation in occurrence of galls in species from different areas within the National Park suggests the need of additional studies that take other variables that can interfere in the distribution pattern of these insects into account.

Keywords: Caatinga, herbivory, interactions, UPGMA.

Introdução

A herbivoria constitui uma das mais importantes interações entre plantas e animais, podendo interferir na regulação das populações vegetais e nos padrões de distribuição destas. Os herbívoros diferem em suas necessidades nutricionais determinando as variadas preferências alimentares de acordo com o *status* nutricional da planta hospedeira (HERMS e MATTSON, 1992; KYTÖ *et al.*, 1996)

Insetos galhadores são herbívoros altamente especializados que através da indução de galhas, obtém alimento e proteção para sua prole. Segundo Fernandes e Price (1992), insetos galhadores representam um extremo do gradiente especialista-generalista, sendo extremamente específicos em relação à escolha do hospedeiro. Os principais indutores de galhas são os dípteros da família Cecidomyiidae (MAIA e FERNANDES, 2004).

É estimada uma riqueza global de 13.000 espécies de insetos indutores de galhas (ESPÍRITO-SANTO e FERNANDES, 2007) e o sistema indutor-hospedeiro tem despertado interesse de diversas áreas de pesquisa, por suas características morfológicas, anatômicas, químicas, evolutivas e genéticas, além de sua grande importância ecológica (PRICE, 1988, FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 1999; SCARELI-SANTOS E VARANDA, 2007).

No Brasil, a maioria dos trabalhos sobre insetos galhadores tem se concentrado principalmente em vegetação de Cerrado, Restinga (GONÇALVES-ALVIM e FERNANDES, 2001; MAIA e AZEVEDO, 2009) e Floresta Atlântica (ALMEIDA-CORTEZ *et al.* 2008; FERNANDES *et al.* 2009), indicando a necessidade de mais estudos sobre a entomofauna de galhadores em regiões, como o semiárido nordestino

O bioma Caatinga ocupa uma área de aproximadamente 826.411,23 km² correspondendo a 10% de todo o território nacional. Apresenta clima tipicamente semiárido, vegetação predominantemente xerófila e bastante heterogênea (CAATINGA, 2010), destacando-se pela riqueza e diversidade de sua flora, composta por diferentes fitofisionomias como caatinga densa, caatinga densa degradada, caatinga aberta e caatinga aberta degradada, formando mosaicos com variados tipos vegetacionais, porém ainda pouco estudados (MMA, 2001; GOMES *et al.* 2006).

Neste cenário, a família Euphorbiaceae destaca-se como a segunda maior em número de espécies com, aproximadamente, 500, das quais, cerca de 20 são endêmicas,

levando a região Nordeste à condição de centro de diversidade da família (SAMPAIO, 1995; BARBOSA *et al.*, 1996; QUEIROZ, 2008; SÁTIRO e ROQUE, 2008).

Alguns estudos apontam para uma tendência de que vegetações esclerófilas, próprias de ambientes xéricos determinam um efeito positivo sobre a riqueza e abundância de insetos galhadores, uma vez que essas plantas tendem a acumular compostos químicos de defesa, aparentemente protegendo as galhas da ação de mastigadores e fungos, seus inimigos naturais (CORNELL, 1983; COLEY *et al.*, 1985; FERNANDES e PRICE, 1988; BLANCH, 2000), o que pode explicar a baixa presença desses inimigos em ambientes quentes e secos (FERNANDES e PRICE, 1992).

Por outro lado, Veldtman e Mcgeoch (2003), defendem que para insetos especialistas como os galhadores, a composição da flora apresenta um efeito mais pronunciado sobre a distribuição dessas espécies. Segundo Fleck e Fonseca (2007), a riqueza de galhadores depende da presença das espécies hospedeiras na comunidade, dada a especificidade da relação.

Apesar de sua representatividade, sobretudo no semiárido do Nordeste, a família Euphorbiaceae pouco foi estudada em relação à associação com galhadores, e as investigações envolvem poucas espécies como, *Colliguaja* spp. (FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 1999; GONZÁLES *et al.*, 2005), *Euphorbia* spp. (GAGNE, 1990; SHORTHOUSE e GASSMANN, 1994; NELSON e CARLSON, 1999), *Sebastiania glandulosa* (MAIA e OLIVEIRA, 2007).

Neste contexto, o presente estudo busca investigar a ocorrência de galhas em espécies de Euphorbiaceae do Parque Nacional do Catimbau (semiárido) e avaliar os padrões de distribuição em níveis genéricos e específicos.

Materiais e Métodos

Área de estudo

O estudo de campo foi conduzido no Parque Nacional do Catimbau, que ocupa uma área de 62.554 ha, abrangendo parte dos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga (figura 1), localizado a 285 km do Recife. O clima é do tipo BShW' (clima quente e seco), típico do semiárido nordestino. A temperatura e a precipitação média

anual são de 26 °C e 600 mm, respectivamente, com maior precipitação entre os meses de abril a junho (SUDENE, 1990).

A vegetação apresenta alta diversidade, com arbustos, algumas árvores perenifólias e um estrato subarbustivo denso incluindo espécies de Campos Rupestres, Restinga e Mata Atlântica, formando um mosaico vegetacional, predominando, porém a fisionomia típica de Caatinga (IBAMA, 2007).

Observações de campo

As observações foram realizadas em visitas pontuais em quatro diferentes áreas do PARNA do Catimbau (Trilha pedra da Concha, Trilha Pedra do Camelo, Trilha Pedra da Igrejinha e Casa de Farinha), aqui designadas trilhas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, entre Setembro de 2008 e Outubro de 2010, em meses alternados, totalizando oito eventos amostrais.

Em cada visita, foram estabelecidos transectos de 10 m x 100 m em cada uma das quatro trilhas e, de forma aleatória, os 50 primeiros indivíduos pertencentes aos gêneros *Croton*, *Cnidoscolus* e *Jatropha* (Euphorbiaceae), foram criteriosamente vistoriados e classificados quanto à presença e ausência de galhas caulinares e foliares. Quando o número de indivíduos dentro da área do transecto não era alcançado, dobrava-se o esforço amostral, visando à uniformização dos dados.

A frequência de galhas para cada espécie foi determinada contando-se o número de indivíduos galhados entre as plantas selecionadas de cada ambiente. Foram consideradas as galhas foliares e caulinares de acordo com o tecido afetado. Ao todo foram amostrados 400 indivíduos por trilha, perfazendo um total de 1.600 ao longo do período de observação. Os percentuais de indivíduos galhados foram calculados e uma matriz de presença e ausência foi gerada (tabela1).

Coleta e identificação do material botânico

Todas as espécies pertencentes aos gêneros *Croton*, *Cnidoscolus* e *Jatropha* presentes nas áreas estudadas foram coletadas e posteriormente identificadas pela Dra. Maria de Fátima Araújo Lucena da Universidade Federal de Campina Grande campus de Patos e pela Dra. Suzene Izídio da Silva, da Universidade Federal Rural de

Pernambuco. As espécies encontradas foram: *Croton heliotropiifolius* Kunth, *C. urticifolius* Lam., *C. adamantinus* Müll. Arg., *C. argyrophyllus* Kunth, *C. grewioides* Baill., *C. blanchetianus* Baill., *C. glandulosus* L., *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl, *C. urens* Pohl, *C. pubescens* Pohl, *C. loefgrenii* Pohl, *C. quercifolius* Pohl, *Jatropha mutabilis* Baill., *J. mollissima* Baill., e *J. ribifolia* (Pohl) Baill. Foram preparadas exsicatas de exemplares das espécies encontradas e depositadas no Herbário UFP (Universidade Federal de Pernambuco) sob os números 56.063, 56.065, 56.066, 56.067, 56.068, 60.186, 61.078, 56.070, 56.071, 59.793, 59.801, 61.089, 56.072, 59.798, 57.798, respectivamente.

Análises de agrupamento

A presença e ausência de galhas entre as espécies foi analisada através do coeficiente de Dice, utilizando o método UPGMA com o auxílio do *software* 2.11X NTSYSpc (ROHLF, 2005).

Resultados e Discussão

Em média, foi registrada a presença de galhas em 31% dos 1.600 indivíduos amostrados, entre as 15 espécies estudadas. Deste percentual, galhas apenas foliares ocorreram em 33% das espécies, seguido das galhas caulinares (20%), enquanto as espécies que apresentaram galhas em ambos os órgãos, representaram 6,5% (tabela 1).

Os resultados apontando a forte ocorrência de insetos galhadores associados à espécies de *Cnidoscolus* e *Croton* (até 71% e 56%), respectivamente, observada nesse estudo, assemelha-se aos obtidos em levantamentos anteriores realizados em áreas de Caatinga, incluindo o PARNA do Catimbau, que mostraram uma maior riqueza de galhadores em espécies de *Croton* e *Cnidoscolus*, com seis e três morfotipos de galhas, respectivamente. Nesse levantamento, Euphorbiaceae e Fabaceae foram as famílias com mais indivíduos galhados, em média 17% (Santos *et al.*, 2009).

Quando as áreas são comparadas, observa-se um forte predomínio de indivíduos galhados na trilha Pedra da Concha (90%). Isto pode ter ocorrido em função da riqueza de espécimes de *Croton adamantinus* (47%), *Cnidoscolus vitifolius* (24%) e *C. urens* (11%) nessa área. Essa trilha é caracterizada por apresentar áreas de vegetação mais aberta, predominantemente arbustiva e caducifólia e solo arenoso, diferindo

nitidamente das demais trilhas (Figura1. a, b, c, d). Sinais de perturbação foram evidenciados em toda a área, em especial na trilha Pedra da Concha, talvez por sua fácil acessibilidade e tipo de vegetação.

Contudo, a espécie mais galhada na trilha 1 (*C. adamantinus*), também ocorre nas trilhas 2,3 e 4 com, respectivamente, 30% 30% e 64% dos indivíduos com galhados.

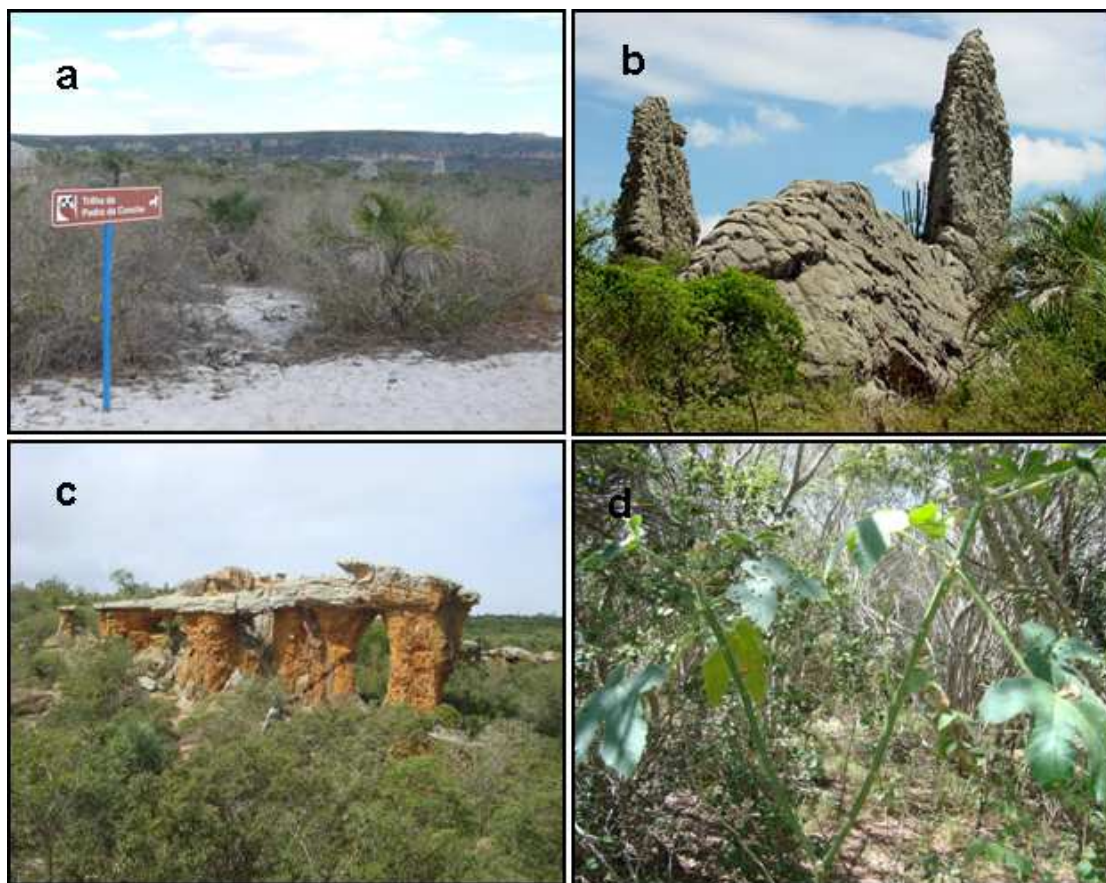


Figura1. Fisionomia das quatro áreas de coletas no PARNA do Catimbau. a) Trilha Pedra da Concha, evidenciando a vegetação arbustiva e o solo arenoso; b) Trilha Pedra do Camelo; c) Trilha Pedra da Igrejinha; d) Trilha Casa de Farinha.

Foram observadas variações na indução de galhas nas espécies de *Croton*. Em *Croton grewoides*, *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* as galhas foram induzidas preferencialmente nas folhas (Figura 2); em *C. adamantinus* e *C. argyrophyllus* registraram-se galhas foliares e caulinares (Figura 2), enquanto não foram observadas galhas em *C. urticifolius* e *C. glandulosus* (Tabela 1). Em geral, a espécie com maior incidência de galhas foi *C. adamantinus* (56%) seguida por *C. argyrophyllus* (41%), (Tabela 1).

Cnidoscolus quercifolius apresentou galhas foliares e caulinares (Figura 3 d), enquanto indivíduos de *C. pubescens* não foram associados a insetos galhadores (Tabela 1). Não foram obtidos registros de galhas em nenhuma das três espécies de *Jatropha* em diferentes populações estudadas durante o período avaliado (Figura 4).

Tabela 1. Ocorrência de galhas em 15 espécies de Euphorbiaceae estabelecidas no Parque Nacional do Catimbau, PE (Brasil).

Espécies	Órgão		Ocorrência (%)
	Folha	Caule	
<i>Croton</i>			
<i>C. adamantinus</i>	+	+	56
<i>C. argyrophyllus</i>	+	+	41
<i>C. grewioides</i>	+	-	14
<i>C. heliotropiifolius</i>	+	-	12
<i>C. urticifolius</i>	-	-	0
<i>C. glandulosus</i>	-	-	0
<i>C. blanchetianus</i>	+	-	22
<i>Cnidoscolus</i>			
<i>C. loefgrenii</i>	+	-	56
<i>C. pubescens</i>	-	-	0
<i>C. quercifolius</i>	+	+	51
<i>C. urens</i>	+	-	67
<i>C. vitifolius</i>	-	+	71
<i>Jatropha</i>			
<i>J.mollissima</i>	-	-	0
<i>J.mutabilis</i>	-	-	0
<i>J.ribifolia</i>	-	-	0

+ = presença, - = ausência

De acordo com a hipótese do estresse higrotérmico (FERNANDES e PRICE, 1988), plantas estabelecidas em ambientes xéricos são mais susceptíveis a insetos galhadores. Isto poderia ser explicado pela tendência das plantas esclerofilas, como as encontradas na Caatinga, concentrarem altos depósitos de compostos secundários nas folhas, podendo proteger insetos galhadores de predadores naturais como fungos e herbívoros mastigadores (CORNELL, 1983; COLEY *et al.*, 1985).

Apesar do elevado registro de galhas para algumas espécies desse estudo (Tabela 1), a relação positiva entre esclerofilia e abundância de galhadores não foi uniforme, o que sugere que outros fatores podem estar pressionando a distribuição dos insetos, ou que a hipótese do estresse higrotérmico (FERNANDES *et al.*, 1988) não se aplique em nível de comunidade para as espécies de Euphorbiaceae da área.

Ao mesmo tempo, a presença e ausência de galhas em espécies co-ocorrentes na mesma área podem ser atribuídas à relação espécie-específica dessa guilda de insetos com os seus hospedeiros, indicando ainda que a composição da flora esteja influenciando a diversidade e abundância desses insetos especialistas, pois, a riqueza destes está diretamente relacionada com a presença de seus respectivos hospedeiros (VELDTMAN e MCGEOCH, 2003; FLECK e FONSECA, 2007).

Embora próximas e com muitas espécies em comum, as quatro áreas de estudo apresentam diferenças fitofisionômicas, o que pode influenciar a riqueza e abundância de insetos galhadores, uma vez que estes são diretamente afetados pelas condições da planta hospedeira (FAGUNDES e FERNANDES, 2001), que por sua vez podem estar respondendo às pressões do meio, de formas diferentes em cada ambiente.

No entanto, vários outros fatores podem atuar como reguladores da população de insetos herbívoros. Price (1991) considera quatro variáveis preponderantes na planta hospedeira que afetam o desempenho dos insetos associados: presença da planta hospedeira no ambiente, variação fenológica, variabilidade genética dentro de uma mesma população de plantas e variação dentro de uma mesma planta.

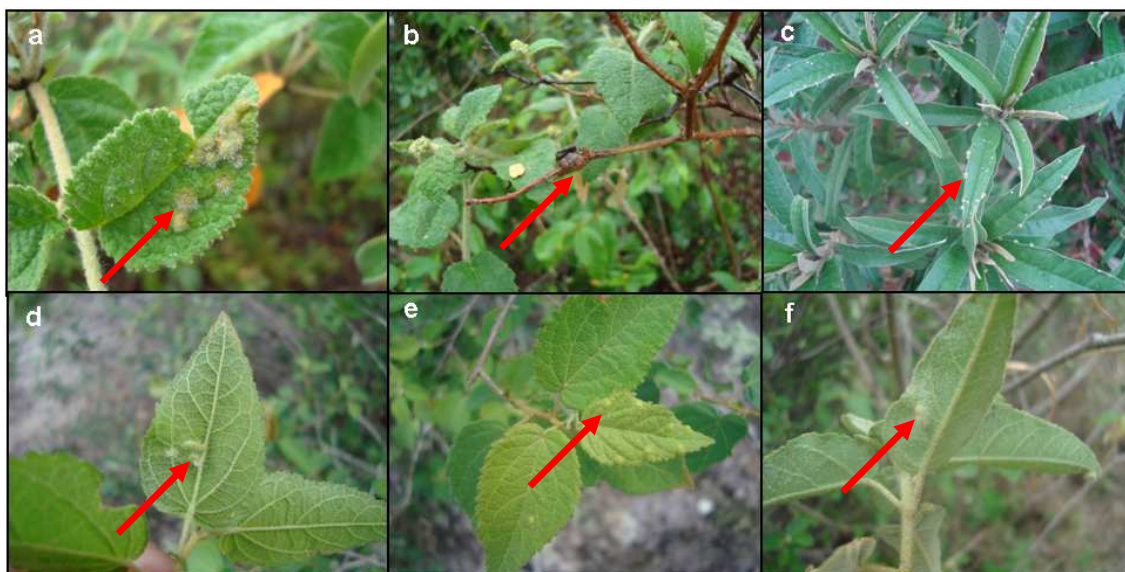


Figura 2. Galhas foliares (a) e caulinares (b) em *Croton adamantinus*; (c) galhas foliares em *Croton argyrophyllus*; (d, e) galhas foliares em *Croton grewioides* e (f) galha foliar em *C. heliotropiifolius*.



Figura 3. Galhas foliares em *Cnidoscolus urens* (a); galhas foliares em *C. loefgrenii* (b); galhas caulinares em *C. vitifolius* (c); galhas foliares (d) e caulinares (e) de *C. quercifolius*; detalhe do ramo de *C. pubescens* (f) sem galha.



Figura 4. Aspectos gerais de espécies de *Jatropha* spp. com galhas ausentes: *Jatropha mollissima* (a); *J. mutabilis* (b) e *J. ribifolia* (c).

O fenograma gerado com base na presença e ausência de insetos galhadores associados às plantas hospedeiras (Tabela 1), independente das trilhas, evidenciou a formação de dois grupos: um menor (A) envolvendo seis espécies que não apresentaram galhas (*Croton urticifolius*, *C. glandulosus*, *Cnidoscolus pubescens*, *Jatropha mollissima*, *J. mutabilis* e *J.ribifolia*) e outro (B) composto por nove espécies que apresentaram galhas foliares e caulinares (*C. adamantinus*, *C. argyrophyllus*, *C. quercifolius*), galhas apenas em folhas (*C. grewioides*, *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus*, *C. loefgrenii*, *C. urens*) e galhas apenas em caules (*Cnidoscolus vitifolius*) (Figura 5).

A formação de grupos contendo espécies de gêneros distintos, estabelecidas na mesma trilha ou em trilhas diferentes, indica mais uma vez que a presença do galhador é determinada pela ocorrência de sua planta hospedeira, o que reforça a especificidade do sistema inseto galhador-planta hospedeira (VELDTMAN e MCGEOCH, 2003; FLECK e FONSECA, 2007).

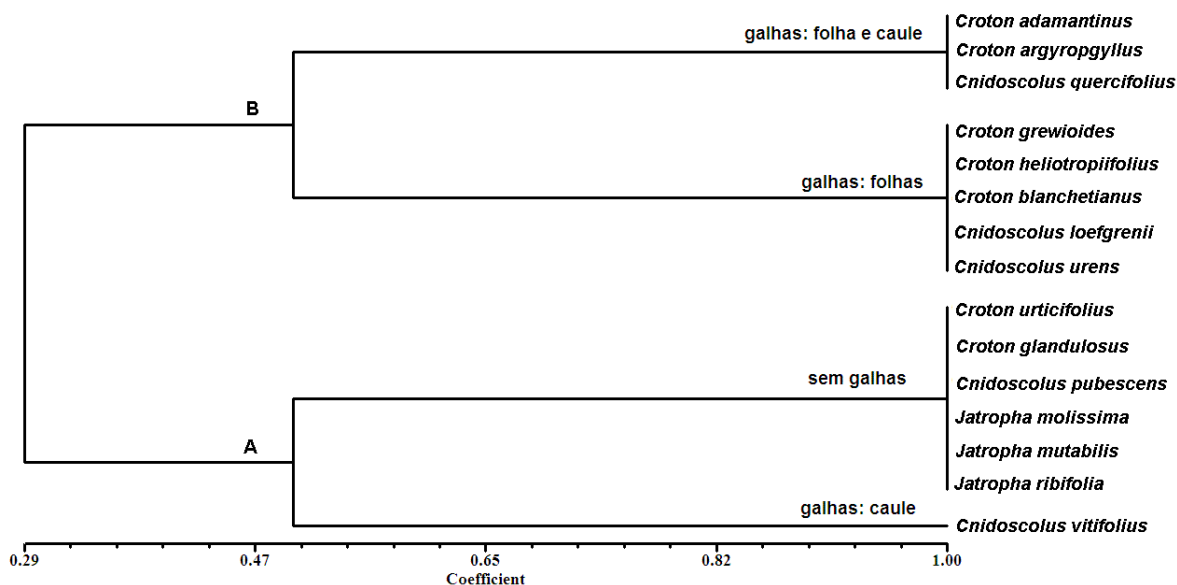


Figura 5. Análise de agrupamento de espécies de Euphorbiaceae do PARNA do Catimbau com e sem galhas, através do coeficiente de Dice, utilizando o método UPGMA com o auxílio do *software* 2.11X NTSYSpc (ROHLF, 2005).

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, foram observadas variações nos padrões de distribuição dos galhadores nos níveis intra e interespecíficos. Variações na ocorrência de galhas entre as espécies estudadas, independente da área, podem indicar que a composição da flora é o principal fator determinante da abundância dos insetos galhadores, associados às espécies de Euphorbiaceae do PARNA do Catimbau, o que pode ser explicado pela especificidade do sistema inseto galhador-planta hospedeira.

No entanto, outras variáveis podem estar produzindo efeitos sobre a distribuição de insetos galhadores no PARNA do Catimbau, necessitando de mais estudos nesse peculiar ambiente do semiárido brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; LEBEL, P.; SILVA, S.C.L. 2008. Gallling insect distribution among plants and leaves of *Psychotria barbiflora* (Rubiaceae) in a fragment of Atlantic forest in northeastern Brazil. **Ecotrópicos** **21**: 46-53.
- BARBOSA, M. R. V. et al. (1996). Checklist preliminar das Angiospermas. SAMPAIO, E.V.S.B.; MAYO, S.J. e BARBOSA, M.R.V. (eds.). In: **Pesquisa Botânica nordestina: progresso e perspectivas**. SBB, Recife. pp.253-414.
- BLANCHE, K.R. 2000. Diversity of insect-induced galls along a temperature-rainfall gradient in the tropical savannah region of the Northern Territory, Australia. **Austral Ecology** **25**: 311-318.
- COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN F.S. III.1985. Resource availability and plant antherbivore defense. **Science** **230**: 895-899.
- CORNELL, H.V. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae (Hymenoptera): why and how? **American Midland Naturalist** **110**: 225-234.
- ESPÍRITO-SANTO, M.M.; FERNANDES, G.W. 2007. How Many Species of Gall-Inducing Insects Are There on Earth, and Where Are They? **Annals of the Entomological Society of America** **100**: 95-99.
- FAGUNDES, M.; FARIA, M.L.; FERNANDES, G. W. 2001. Efeitos da distribuição de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) na Abundância e no parasitismo de galhas de *Neopelma baccharidis* (Homóptera: Psyllidae). **Unimontes Científica** **1**: 97-103.
- FERNANDES, G.W.; PRICE, P.W. 1988. Biogeographical gradients in galling species richness: tests of hypotheses. **Oecologia** **76**: 161 - 167.
- FERNANDES, G.W.; Price, P.W. 1992. The adaptive significance of insects gall distribution: survivorship of species in xeric and mesic habitats. **Oecologia** **90**: 14-20.
- FERNANDES, S. P. C.; CASTELO-BRANCO, B.; ALBUQUERQUE, F. A.; FERREIRA, A. L. N.; RAMOS, A. B. B.; BRAGA, D. V. V.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. 2009. Galhas entomógenas em um fragmento urbano de mata

- Atlântica no Centro de Endemismo de Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências** 7: 240-244.
- FLECK, T. e FONSECA, C.R. 2007. Hipóteses sobre a riqueza de insetos galhadores: uma revisão considerando os níveis intra-específicos, interespecíficos e de comunidade. **Neotropical, Biology and Conservation** 2: 36-45.
- FUENTES-CONTRERAS E.; GIANOLI E.; CABALLERO P. P.; NIEMEYER H. M. (1999). Influence of altitude and host-plant species on gall distribution in *Colliguaja* spp. (Euphorbiaceae) in central Chile. **Revista Chilena De Historia Natural** 72: 305-313.
- GAGNÉ, R.J. (1990). Gall Midge Complex (Diptera: Cecidomyiidae) in Bud Galls of Palearctic *Euphorbia* (Euphorbiaceae). **Annals of the Entomological Society of America** 83: 335-345.
- GOMES, A.P.S.; RODAL, M.J.N.; MELO, A.L. (2006). Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifólia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20: 37-48.
- GONÇALVES-ALVIM, S.J. e FERNANDES, G.W. 2001. Comunidades de insetos galhadores (Insecta) em diferentes fisionomias do cerrado em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 18: 289-305.
- GONZALES W.L.; CABALLERO P.P.; MEDEL, R. (2005). Galler-induced reduction of shoot growth and fruit production in the shrub *Colliguaja integerrima* (Euphorbiaceae). **Revista Chilena de Historia Natural** 78: 393-399.
- IBAMA. 2007. Parque Nacional do Catimbau. Accessible at <http://www.ibama.gov.br/siucweb/mostraUc.php?seqUc=1438>. Captured on June 2009.
- Kasahara, S. and Y. Yonenaga-Yassuda 1983. Sex-chromosome variability
- HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology** 67: 283-335.
- KYTÖ, M.; NIEMMELA, P.; LARSON, S. 1996. Insects on tress: population and individual response to fertilization. **Oikos** 75:148-159.

- MAIA, V.C.; FERNANDES, G.W. 2004. Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia** 6: 423-445.
- MAIA, V.C.; AZEVEDO, M.A.P. 2009. Diversidade de micro-himenópteros associados com galhas de Cecidomyiidae (Diptera) em restingas do estado do Rio de Janeiro (Brasil). **Biota Neotrop.**, 9: 151-164.
- MAIA, V.C.; OLIVEIRA U.P. 2007. A new species of Cecidomyiidae (Diptera) associated with *Sebastiania glandulosa* (Euphorbiaceae). **Iheringia, Sér. Zool.** 97: 89-96.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2001. **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade na Amazônia brasileira**. Brasília: MMA/SBF.144p.
- NELSON, J.A.; CARLSON, R.B. 1999. Observations on the biology of *Spurgia apitigena* brems on leafy Spurge in North Dakota. **Biological Control** 16: 128-132.
- PRICE, P.W. (1988). Inversely density-dependent parasitism: the role of plant refuges for hosts. **Journal of Animal Ecology** 57: 89-96
- PRICE, P. W. 1991. The plant vigor hypotheses and herbivore attack. **Oikos** 62: 244-251.
- QUEIROZ, L. P.(2008). Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, **Royal Botanic Gardens Kew**, Associação plantas do Nordeste, 443 p. il.
- ROHLF, F. J. 2005. **NTSYS-Pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Setauket: Exeter Software.
- SAMPAIO, E.V.S.B. (1995). Overview of the Brazilian Caatinga. In: Bullock SH, Mooney HA, Medina E. (ed.), **Seasonally dry tropical forest**, Cambridge:Cambridge University Press. pp.35-63.
- SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N. 2008. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio. **Acta Bot. Bras.** 22:99-118.
- SCARELI-SANTOS, C.; VARANDA, E.M. 2007. Estudo Morfológico das Galhas Foliares de *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Biociência** 5:735-737.

SHORTHOUSE, J.D.; GASSMANN, A. (1994). Gall induction by *Pegomya curticornis* (Stein) (Diptera: Anthomyiidae) within the roots of spurges *Euphorbia virgata* Walkdst. and Kit. E. esula L. (Euphorbiaceae). **The Canadian Entomologist** **126**: 193-197.

SUDENE. 1990. **Dados pluviométricos mensais do Nordeste**. Recife, Pernambuco.

VELDTMAN, R.; MCGEOCH, M.A. 2003. Gall-forming insect species richness along a nonscleromorphic vegetation rainfall gradient in South Africa: The importance of plant community composition. **Austral Ecology** **28**:1-13.

CAATINGA. Disponível em:

<http://www.wwf.org.br/informacoes/questoes_ambientais/biomas/bioma_caatinga/
(Acesso em: 15/11/10).

Capítulo 2

***n*-ALCANOS CUTICULARES EM ALGUMAS ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO E ASPECTOS QUIMIOTAXONÔMICOS**

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Biochemical Systematics and Ecology*

***n*-ALCANOS CUTICULARES EM ALGUMAS ESPÉCIES DE
EUPHORBIACEAE DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO: COMPOSIÇÃO E
ASPECTOS QUIMIOTAXONÔMICOS**

RESUMO

A superfície primária dos órgãos aéreos da maioria dos vegetais é recoberta pela cutícula, cuja função primordial é o controle do balanço hídrico, porém exercendo várias outras funções, de acordo com suas propriedades químicas e físicas. A cutícula é formada basicamente por uma matriz de cutina associada às ceras intracuticulares e epicuticulares, cuja composição química e morfologia determinam as propriedades da cutícula. O padrão químico pode caracterizar uma espécie vegetal, parte da planta ou fase de desenvolvimento, podendo representar valor taxonômico, sobretudo em grupos complexos como a família Euphorbiaceae. Essa família é a segunda com maior representatividade nos trópicos e destaca-se pela plasticidade fenotípica, bem como pelo amplo espectro de compostos químicos de suas espécies. Desta forma, o estudo teve como objetivos conhecer a composição química das ceras epicuticulares foliares de alguns representantes de Euphorbiaceae ocorrentes em região semiárida do Brasil e testar o potencial quimiotaxonômico dos *n*-alcanos para essas espécies, através análises de agrupamento (distância Euclidiana e UPGMA). De acordo com os padrões de distribuição dos *n*-alcanos, verificou-se o predomínio dos homólogos ímpares, principalmente nonacosano (C29) para a maioria das espécies de *Croton*, untriacontano (C31) entre as espécies de *Jatropha* e tritriacontano (C33) para as espécies de *Cnidoscolus*. As análises por UPGMA produziram um relativo agrupamento das espécies de cada gênero, sobretudo em função do predomínio de alguns alcanos específicos.

Palavras chave: Caatinga, análise numéricas, sistemática vegetal, CG/EM

CUTICULAR *n*-ALKANES IN SOME EUPHORBIACEAE SPECIES FROM SEMI-ARID BRAZILIAN: COMPOSITION AND CHEMOTAXONOMICAL ASPECTS

ABSTRACT

Most of plants' aerial organs have their primary surface covered by the cuticle, which acts mainly controlling the hydric balance, but may serve many other roles as a reflex of its chemical and physical properties. The cuticle is basically made of a cutin matrix associated to inner and outer epicuticular waxes, which properties are determined by its morphology and chemical composition. The chemical pattern may characterize a plant species, part of the plant or development phase, being capable of providing taxonomical power especially in complex groups like the Euphorbiaceae family. This family is the second larger in tropics and contrasts for its phenotypic plasticity, and also for its wide range of chemical compounds present in its species. For these reasons, this study aimed on finding more about the chemical composition of the leaf epicuticular waxes from some of the Euphorbiaceae species present in the Brazilian semi-arid and testing the chemotaxonomical potential of the *n*-alkanes through grouping analysis (Euclidian distance and UPGMA). Results from distribution patterns found for the *n*-alkanes showed dominance of the odd homologues, mainly nonacosanes (C29) for most of the *Croton* species, untriacontanes (C31) among *Jatropha* species and tritriacontanes (C33) for *Cnidocolus* species. UPGMA analysis sorted species in groups of each genus, mainly in function of the dominance of some specific alkanes.

Key words: Caatinga, numerical analysis, plant systematics, GC/MS

Introdução

Cera cuticular vegetal é o termo comumente usado para descrever o conjunto de componentes hidrofóbicos da cutícula que recobre a superfície primária dos órgãos aéreos da maioria das plantas (KOLATTUKUDY, 1980). A cutícula é formada basicamente por uma matriz de cutina entremeada com ceras intracuticulares e coberta por ceras epicuticulares (HEREDIA, 2003).

As ceras intra e epicuticulares são formadas principalmente por hidrocarbonetos, ácidos graxos, ésteres, alcoóis primários e secundários, cetonas e aldeídos, além de compostos cíclicos e aromáticos como flavonóides e terpenóides, em menores proporções (RIEDERER e MARKSTÄDTER, 1996; MULLER E RIEDEERER, 2005). Cada classe é composta de uma série homóloga de isômeros e o padrão químico pode caracterizar um grupo taxonômico, parte da planta ou fase de desenvolvimento (BAKER, 1982).

Vários estudos demonstram variações quantitativas e qualitativas dos componentes cuticulares, em função de fatores diversos. Por exemplo, foram verificadas mudanças na estrutura e na composição das ceras em gramíneas e em cultivares de algodão, soja e gergelim submetidos a diferentes tipos de estresse, principalmente hídrico (BONDADA *et al.*, 1996; ROMMERSKIRCHEN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007a; KIM *et al.*, 2007b). Nessas plantas foi observado um substancial aumento dos compostos de cadeias longas, sobretudo *n*-alcanos.

Os hidrocarbonetos, principalmente os *n*-alcanos (cadeia de comprimento C21 a C35), constituem os compostos mais comuns nas ceras cuticulares, formando uma série homóloga e diferindo entre si pelo número de carbonos (WALTON, 1990; AHMAD *et al.*, 1996; MARKSTADTER *et al.*, 2000; KNUST e SAMUELS, 2003; MÜLLER e RIEDERER, 2005), entretanto nem sempre representam a classe mais abundante.

Dove e Mayes (1991) referem-se aos *n*-alcanos como a “impressão digital” da cutícula, uma vez que, supostamente cada planta possui um perfil único desses hidrocarbonetos, podendo desta forma, caracterizar um determinado grupo taxonômico.

A utilidade dos *n*-alcanos como potenciais marcadores taxonômicos foi relatada para diferentes grupos de plantas, como Melastomataceae, Leguminosae, Moraceae, Malpighiaceae, Solanaceae (MIMURA *et al.*, 1998; MERINO *et al.*, 1999;

MUBO *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2009; MOHY-UD-DIN *et al.*, 2010), entre outros, indicando a importância desta classe para a quimiosistemática.

Métodos utilizando DNA nuclear ribossomal (nrRNA) e sequência de espaçadores moleculares internos (ITS), do fragmento *trnL-F* e DNA plastidial, entre outros métodos moleculares, foram empregados em algumas espécies de *Euphorbia*, *Croton*, *Macaranga*, *Jatropha* (WURDACK *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 2005; KULJU *et al.*, 2007; PAMIDIMARRI *et al.*, 2008). No entanto, apesar da comprovada eficácia quimiotaxonômica das ceras epicuticulares e da importância da família Euphorbiaceae nos trópicos, sobretudo em regiões semiáridas, não há até a presente data, nenhum registro de análises químicas das ceras epicuticulares para as espécies propostas neste estudo, bem como sobre a sua utilização como marcadores taxonômicos.

Para Wurdack *et al.* (2005) de todas as famílias botânicas, Euphorbiaceae são insuperáveis na riqueza de espécies, plasticidade morfológica, diversidade fitoquímica e importância econômica, porém ainda pouco explorada (LUCENA, 2009). No que se refere às investigações sobre a composição química e a utilidade quimiotaxonômica das ceras cuticulares, os estudos, de um modo geral, têm se restringido basicamente aos gêneros *Macaranga* (FEDERLE *et al.*, 1997; MARKSTÄDTER *et al.*, 2000; GUHLING *et al.*, 2005), *Euphorbia* (GNECCO *et al.*, 1989; NAZIR *et al.*, 1993; AHMAD *et al.*, 1996), *Ricinus* (VERMEER *et al.*, 2003; GUHLING *et al.*, 2006), e alguns trabalhos isolados com espécies de *Cnidoscolus* e *Sapium* (VALLE e KAPLAN, 2000; ESCALANTE-EROSA *et al.*, 2004).

Assim, este trabalho teve como objetivo conhecer o perfil químico das ceras epicuticulares foliares de 15 espécies pertencentes a três gêneros de Euphorbiaceae que ocorrem em região semiárida do Nordeste do Brasil, analisar o padrão de distribuição dos *n*-alcanos e testar o potencial quimiotaxonômico dessa classe de compostos.

Material e Métodos

Local de Estudo

As coletas foram realizadas no Parque Nacional do Catimbau, Buíque - PE, situado a 295 km do Recife. O Parque compreende um polígono de 611 km² abrangendo, aproximadamente, 62.300 ha (Figura 1), destacando-se pela riqueza e diversidade de sua flora, composta por diferentes fitofisionomias como caatinga densa, caatinga densa

degradada, caatinga aberta e caatinga aberta degradada, formando mosaicos com variados tipos vegetacionais, porém ainda pouco estudados (MMA, 2001; ANDRADE *et al.* 2004; GOMES *et al.* 2006). O clima é do tipo BShW' (clima quente e seco), com temperatura e precipitação médias anuais em torno de 25 °C e 600 mm, respectivamente, com maior pluviosidade entre os meses de abril a junho (SUDENE 1990).



Figura 1. Localização do Parque Nacional do Catimbau e áreas de coleta: a) Trilha Pedra da Concha; b) Trilha Pedra do Camelo; c) Trilha da Igrejinha; d) Trilha da Casa de Farinha. Fonte: Adaptado de IBAMA (2007).

Coleta e identificação do material botânico

Folhas íntegras de indivíduos adultos foram coletadas de cada dez espécimes de *Croton adamantinus* Müll. Arg., *C. argyrophyllus* Kunth, *C. grewioides* Baill., *C. blanchetianus* Baill., *C. glandulosus* L., *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. urticifolius* Lam., *Cnidoscolus pubescens* Pohl, *C. urens* Pohl, *C. vitifolius* (Mill.) Pohl, *C. quercifolius* Pohl, *C. loefgrenii* Pohl, *Jatropha mollissima* Baill., *J. mutabilis* Baill. e *J. ribifolia* (Pohl) Baill. Os espécimes foram identificados pela Dra. Maria de Fátima Araújo Lucena (UFCG) e pela Dra. Suzene Izídio da Silva (UFRPE), e depositados no Herbário

UFP (Universidade Federal de Pernambuco) sob os números 56.066, 56.067, 56.068, 61.078, 59.798, 56.063, 56.065, 59.793, 56.071, 56.070, 61.076, 56.066, 57.797, 56.072, 57.798, respectivamente.

Obtenção das ceras epicuticulares

As folhas foram secas à sombra e as ceras epicuticulares extraídas a partir de duas imersões sucessivas em diclorometano, com leve agitação durante 30s. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório e posteriormente submetidos às técnicas analíticas de fracionamento e identificação.

Fracionamento das ceras

Inicialmente, os extratos brutos foram fracionados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como adsorvente, gel de sílica G 60, impregnada com fluoresceína sódica 0,02% (Sigma-Aldrich®) e desenvolvida com a fase móvel *n*-hexano:diclorometano (73:27 v/v) (SALATINO e SILVA, 1988). Posteriormente, os cromatogramas foram revelados sob luz UV de onda longa, e a fração correspondente aos *n*-alcanos foram isoladas para análises qualitativas e quantitativas

Cromatografia Gasosa (CG-FID)

A composição da fração de *n*-alcanos foi analisada por cromatografia gasosa (Shimadzu 17A Ver. 3, Kyoto, Japão), utilizando uma coluna capilar DB-5 (30 m, 0,32 mm, 5% fenil-95% dimetilpolissiloxano) e hélio como gás de arraste, com uma vazão de 1 cm³. min⁻¹ e split de 1/1000. A temperatura do injetor e do detector foi de 300 °C. A temperatura da coluna variou de 150 °C (3 min) a 280°C a 10°C min⁻¹ e mantidas até a temperatura final em condições isotérmicas por 34 min. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação com uma solução padrão de alcanos C21-C40 (mistura n°. 04071) da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO) e com espectros de massas obtidos em um GCMS-QP5050A, operando por impacto de elétrons (70 eV).

2.6. Análise numérica

A partir da distribuição quantitativa dos *n*-alcanos foi realizada uma análise de agrupamento por distância Euclidiana e UPGMA utilizando *software* 2.11X NTSYSpc (ROHLF, 2005).

Resultados e discussão

3.1. Composição química das ceras epicuticulares

A partir das análises qualitativas e quantitativas por CCD (método gravimétrico) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG/EM), foi constatada a presença das classes químicas comumente encontradas nas ceras cuticulares das plantas, como *n*-alcanos, alcoóis primários, ácidos graxos e triterpenos (BAKER, 1982; WALTON, 1990). Em conjunto, a distribuição das classes químicas entre as espécies analisadas mostrou-se variada, com um leve predomínio dos *n*-alcanos em relação às demais.

3.2. Distribuição e abundância de *n*-alcanos

As cadeias de hidrocarbonetos, em geral, variaram do C21 ao C35, predominando os homólogos ímpares C29 (nonacosano), C31 (untriacontano) e C33 (tritriacontano), respectivamente, sendo as maiores concentrações encontradas no C33 (>70%) em espécies de *Cnidoscolus*. Heptacosano (C27) e pentacosano (C25) também foram detectados na maioria das espécies estudadas, porém em concentrações bem inferiores (Tabela 1). Entre as séries pares, o octacosano (C28) esteve presente na maioria das espécies, mas em baixas concentrações (Tabela 1).

Análises qualitativas dos *n*-alcanos cuticulares têm demonstrado o predomínio das séries ímpares C25 a C35, na maioria das espécies estudadas. Maxzud e Zydgalo (1991) estudando os alcanos foliares em 21 populações de *Solanum* estabelecidas na Argentina, observaram o predomínio do heptacosano em *S. glaucophyllum*, tritriacontano em *S. elaeagnifolium*, *S. juvenali* e *S. euacanthum*, enquanto o untriacontano dominou as ceras de *S. stuckertii* e *S. adelphum*.

Jenks *et al.* (1995) identificaram a presença do alceno untriacontano (C31) como majoritário nas ceras foliares e do nonacosano (C29), dominando a cera caulinar de *Arabidopsis thaliana*, resultados confirmados por Knust e Samuels (2003). Em *Ligustrum vulgare* (Oleaceae) o *n*-alceno tritriacontano (C33) dominou a composição da cera epicuticular (BUSCHHAUS *et al.*, 2007). Em geral, o predomínio dos homólogos ímpares de cadeias mais longas tem sido uma tendência em ceras cuticulares de diferentes espécies (WALTON, 1990; MÜLLER e RIEDERER, 2005).

Tabela 1. Distribuição e abundância de *n*-alcanos epicuticulares foliares em espécies de Euphorbiaceae ocorrentes no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco - Brasil.

Espécies	<i>n</i> -Alcanos %												
	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33
Croton													
<i>C. adamantinus</i>	-	-	-	3,65	3,04	-	13,40	3,25	38,0	-	25,50	-	-
<i>C. argyrophyllus</i>	-	-	-	-	5,44	-	14,61	-	43,4	-	25,80	-	-
<i>C. blanchetianus</i>	-	-	1,53	1,98	2,77	1,71	11,13	1,68	42,6	-	13,68	-	-
<i>C. glandulosus</i>	-	-	-	-	1,97	-	10,00	1,83	40,2	1,75	22,0	-	8,10
<i>C. grewoides</i>	-	-	1,12	1,45	2,94	2,04	12,9	5,77	43,0	1,70	17,0	1,32	4,43
<i>C. heliotropiifolius</i>	1,29	1,11	1,40	1,47	3,33	1,52	4,26	1,58	23,5	3,39	35,94	1,83	5,99
<i>C. urticifolius</i>	2,67	-	-	-	3,52	-	5,56	-	21,8	-	24,32	2,52	3,72
Cnidoscolus													
<i>C. loefgrenii</i>	-	-	-	-	-	-	1,56	-	5,09	-	29,07	3,99	54,05
<i>C. urens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	4,91	-	31,93	-	63,15
<i>C. pubescens</i>	-	-	-	-	-	0,48	0,56	1,68	1,57	-	35,45	4,81	53,15
<i>C. vitifolius</i>	-	-	-	-	-	-	3,51	-	26,7	-	51,01	-	18,75
<i>C. quercifolius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78	-	16,83	2,94	70,56
Jatropha													
<i>J. mollissima</i>	-	0,93	1,00	-	2,29	2,16	14,04	2,53	30,6	2,64	26,70	-	7,89
<i>J. mutabilis</i>	-	0,25	0,33	0,61	4,16	1,93	14,18	1,56	14,4	-	37,51	2,52	14,23
<i>J. ribifolia</i>	-	0,85	0,50	0,99	0,11	1,45	8,24	2,06	18,7	1,54	25,31	4,03	11,99

- não detectado

Maiores teores de *n*-alcanos de cadeias longas têm sido relacionados às ceras de plantas submetidas a diferentes tipos de estresse, sobretudo hídrico. Em ambientes xéricos os *n*-alcanos assumem importante papel, uma vez que conferem caráter mais hidrofóbico à superfície cuticular, minimizando assim as perdas de água pela planta (KERSTIENS, 1996; SCORA & SCORA, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003; KOSMA *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos têm associado o padrão de distribuição dos compostos das ceras cuticulares a uma adaptação evolutiva para ambientes áridos, como por exemplo,

o sucesso evolutivo das gramíneas C4 em áreas extremamente áridas, que apresentam relativa abundância de *n*-alcanos de cadeia longa (ROMMERSKIRCHEN *et al.*, 2006). Segundo esses autores, plantas C4 desenvolveram vantagem sobre as plantas C3 em regiões quentes e áridas como resultado do relativo aumento no teor dos componentes de cadeia mais longa da cera, o que permite uma elevação no ponto de fusão. A presença de elevados teores de *n*-alcanos de cadeias longas verificado neste estudo pode estar relacionada com a pressão do ambiente semiárido sobre as espécies de *Croton*, *Cnidoscolus* e *Jatropha*.

No presente estudo, em conjunto, as ceras de *Croton* foram dominadas pelos homólogos nonacosano (C29) e untriacontano (C31), seguido pelo heptacosano (C27), no entanto, o padrão de distribuição mostrou forte presença do nonacosano, mesmo nas espécies em que ele não foi majoritário. Alcanos com 29 carbonos predominaram em plantas distribuídas em *Croton adamantinus* (38,8%), *C. argyrophyllus* (43,4%), *C. blanchetianus* (42,6%), *C. glandulosus* (40,2%) e *C. grewioides* (43%), enquanto o C31 predominou em *C. heliotropiifolius* (35,9%) e *C. urticifolius* (24,3%) (Tabela 1).

Com exceção de *Cnidoscolus vitifolius* que apresentou o C31 e C29 como majoritários, as espécies de *Cnidoscolus* destacaram-se pelos altos teores de tritriacontano (C33), e untriacontano (C31). *C. loefgrenii* (>54%), *C. urens* (>63%), *C. pubescens* (>53%) e *C. quercifolius* (>70%), apresentando a maior concentração entre todas as espécies estudadas. Entre as espécies de *Jatropha* foram observadas concentrações do C31 acima de 37%, 26% e 25%, respectivamente em *J. mutabilis*, *J. mollissima* e *J. ribifolia*, porém foi observado um leve domínio do C29 em *J. mollissima* (30,7%) (Tabela 1).

O predomínio dos alcanos de cadeia longa observado neste trabalho, está de acordo com dados da literatura para algumas espécies de Euphorbiaceae. Nazir *et al.* (1993) e Ahmad *et al.* (1996) detectaram alcanos de cadeias longas como os principais compostos em espécies de *Euphorbia*. Valle e Kaplan (2000) analisando os alcanos de duas espécies de *Sapium* encontraram heptacosano (C27) e nonacosano (C29) dominando a cera de *S. glandulatum*, enquanto *S. sellowianum* apresentou pentacosano (C25) e heptacosano como majoritários. Vermmer *et al.* (2003) identificaram heptacosano e nonacosano como os principais alcanos em ceras foliares de *Ricinus communis*.

3.3. Similaridade química

A análise por distância Euclidiana e UPGMA com base na distribuição dos *n*-alcanos, permitiu um relativo agrupamento intraespecífico, sobretudo em função do predomínio dos homólogos C29, C31 e C33 entre as espécies, e o predomínio de algumas séries de homólogos dentro de cada gênero pode indicar o uso dos *n*-alcanos como marcadores com algum valor diagnóstico ao nível infra-familiar.

De acordo com o fenograma gerado pode-se separar as espécies em dois agrupamentos. Um maior (A) contém as sete espécies de *Croton* (A1), juntamente com as três espécies de *Jatropha* (A2), além de uma espécie de *Cnidoscolus* (A3). Nessas espécies foi observado o predomínio de cadeias carbônicas com 29 e 31 átomos.

O grupo B foi formado pelas espécies de *Cnidoscolus* (B1 e B2), cujo padrão de distribuição se caracterizou pelos elevados teores do C33 (54%-70%) e do C31 (29%-51%), além da ausência de alcanos de cadeia curta (C21 a C25). A exceção foi *C. vitifolius* (A3) que se posicionou próximo às espécies de *Jatropha* e *Croton*, devido à elevada concentração do nonacosano (C29), diferindo das demais espécies de *Cnidoscolus*.

O agrupamento entre *Croton adamantinus*, *C. argyrophyllus*, *C. blanchetianus*, *C. grewioides*, *C. glandulosus* se deu em função dos altos teores de nonacosano (C29) em comum (Figura 2, A1), enquanto *C. heliotropiifolius* e *C. urticifolius*, agruparam próximos às espécies de *Jatropha* devido ao predomínio do untriacontano (C31).

Entre as espécies de *Jatropha*, *J. mutabilis* se posicionou mais externamente, provavelmente pela maior concentração do untriacontano (C31), porém o padrão de distribuição, com a presença de cadeias mais curtas, nas três espécies (Tabela 2), possibilitou um relativo agrupamento dentro do gênero (Figura 2, A2).

As espécies de *Cnidoscolus*, com exceção de *C. vitifolius*, formaram um grupo mais externo e destacam-se pelos elevados teores de tritriacontano. Apesar de *Cnidoscolus* haver sido tratado por Miller e Webster (1962) como secção ou subgênero de *Jatropha*, o perfil de alcanos observado nos dois gêneros mostrou pouca similaridade, concordando com Melo e Sales (2008), que se referem a esses gêneros como distintos, com base em características morfológicas.

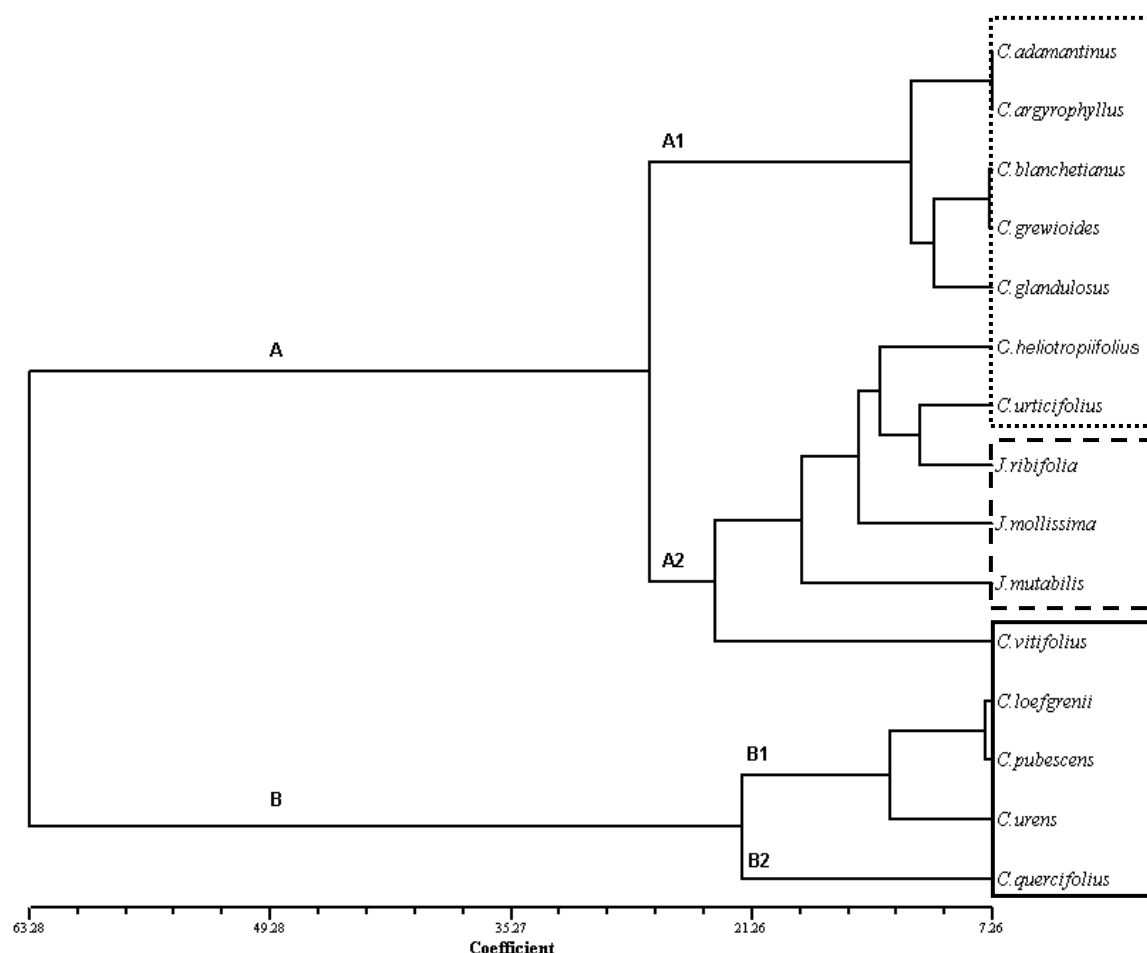


Figura 2. Relação de afinidade entre 15 espécies de Euphorbiaceae do PARNA do Catimbau (Buíque-PE), baseada na distribuição de *n*-alcanos cuticulares foliares, obtida por Distância Euclidiana e UPGMA. *Croton* spp.; *Jatropha* spp.; *Cnidoscolus* spp.

O valor dos alcanos de ceras como marcadores quimiotaxonômicos em níveis de família, subfamília e tribo foi confirmado para Umbeliferae, Cruciferae, Leguminosae, Cactaceae, Moraceae, Araucariaceae, Cupressaceae, Pinaceae, Crassulaceae, Malpighiaceae e Solanaceae (STEVENSON *et al.*, 1994; MAFFEI, 1996; MAFFEI *et al.*, 1997; MAFFEI, 2004; MUBO *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2009; MEDINA *et al.*, 2004; MOTTA *et al.*, 2009; MOHY-UD-DIN *et al.*, 2010), indicando a importância dessa classe de compostos para a quimiosistemática.

O amplo espectro de compostos secundários juntamente com a biologia molecular é fortemente ressaltado como ferramentas indispensáveis à interpretação das relações evolutivas entre subfamílias de Euphorbiaceae s.l. (ESSER, 1997; DAVIS *et al.*, 2007).

Alguns estudos utilizando variados métodos têm sido conduzidos para tentar resolver problemas taxonômicos na complexa família Euphorbiaceae. Manners e Davis

(1986) examinando o potencial quimiotaxonômico de ceras para classificação intraespecífica em *Euphorbia* observaram similaridade qualitativa geral, com exceção de alguns constituintes específicos, principalmente os triterpenos. Análises químicas com ceras de cinco espécies de *Euphorbia* revelaram o predomínio de compostos saturados, com as cadeias de hidrocarbonetos variando de C19 a 37, sendo observadas diferenças quantitativas entre alguns compostos (HERMES e GIDLZ, 1987).

Segundo Grayer *et al.* (1999) árvores moleculares baseadas em DNA rbcL parecem úteis em estudos comparativos de classes de compostos secundários como ferramenta quimiotaxonômica. Por outro lado produtos químicos podem ser usados como apoio adicional para árvores moleculares.

Conclusão

Os padrões de distribuição dos *n*-alcanos cuticulares foliares permitiu caracterizar as espécies de *Croton* pela presença majoritária do composto nonacosano (C29), o gênero *Jatropha* foi caracterizado pelo predomínio do untriacontano (C31), enquanto o gênero *Cnidoscolus* foi caracterizado pelos elevados teores do tritriacontano (C33). Com base no predomínio de algumas séries de homólogos e do relativo agrupamento das espécies em seus respectivos gêneros, pode-se sugerir o uso dos *n*-alcanos como marcadores taxonômicos com algum valor diagnóstico ao nível infrafamiliar. No entanto, o estudo deve ser ampliado a um maior número de espécies, visando à obtenção de resultados mais consistentes. Dados fitoquímicos fornecidos pelo perfil químico das ceras cuticulares, associados à distribuição de outros metabólitos e à biossíntese, podem conter informações úteis sobre as relações dentro da família Euphorbiaceae e com famílias filogeneticamente relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, W.; NAZIR, M.; CHAUDHARY, F. M.; AHMAD, A.1996. Hydrocarbon distribution in epicuticular waxes of five *Euphorbia* species. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** 51:291-295.
- ANDRADE, K.V.S.A.; RODAL, M.J.N.; LUCENA, M.F A.; GOMES, A.P.S. 2004. Composição florística de um trecho do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco - Brasil. **Hoehnea** 31: 337-348.
- BAKER, E. A.1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In The Plant Cuticle, Linnean Society Symposium Series (eds D.F. Cutler, K.L. Alvin & C.E. Price), 10:139-165. **Academic Press**, London.
- BERRY, P.; HIPPI, KENNETH, A. J. WURDACK; VAN, B.; RIINA, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe crotonae (Euphorbiaceae Ssensu stricto) using its and trnL-trnF DNA. **American Journal of Botany** 92: 1520-1534.
- BONDADA, B.R.; OOSTERHUIS, D.M.; MURPHY, J.B.; KIM, K.S. 1996. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. **Environmental and Experimental Botany** 36: 61-69.
- BUSCHHAUS, C.; HERZ, H.; JETTER, R. 2007. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist.**, 176: 311-316.
- DOVE, H.; MAYES, R.W. 1991.The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. **Aust. J. Agric. Res.**, 42: 913-952.
- ESCALANTE-EROSA, F.; ORTEGÓN-CAMPOS, I.; PARRA-TABLA, V.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. 2004. Chemical Composition of the Epicuticular Wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. **Rev. Soc. Quím. Méx.** 48:24-25.
- FEDERLE, W.; MASCHWITZ, U.; FIALA, B.; RIEDERER, M.; HOLLDÖBLER, B. 1997. Slippery Ant & plants and Skiful climbers: Selection and protection of

- specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). **Oecologia 112**: 217-224.
- GNECCO, S.; BARTULÍN, J.; MARTICORENA, C.; RAMÍREZ, A. 1988. *n*-alkanes from Chilean Euphorbiaceae and Compositae species **Biomass**. 15:165-173.
- GOMES, A.P.S. 2006. Revisão das espécies sul-americanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). Tese de Doutorado. **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Recife. 124p.
- GUHLING, O.; HOBL, B.; YEATS, T.; JETTER, R. 2006. Cloning and characterization of a lupeol Synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. **Arch Biochem Biophys.**, **448**: 60-72.
- GUHLING, O; KINZLER, C.; DREYER, M.; BRINGMANN, G.; JETTER, R. 2005. Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. **Journal of Chemical Ecology 31**: 2325-2343.
- HEREDIA, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta 1620**: 1-7.
- JENKS, M.A.; TUTTLE, H. A.; EIGENBRODE, S.D.; FELDMANN, K.A. 1995. Leaf epicuticular waxes of the eceriferum mutants in *Arabidopsis*. **Plant Physiology 108**: 369-377.
- KIM, K. S.; PARK, S. H.; JENKS, M. A. 2007a. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. **J. Plant Physiol.**, **164**: 1134-1143.
- KIM, K. S.; PARK, S. H.; KIM, D. K., JENKS, M. A. 2007b. Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* L.). **Int. J. Plant Sci.**, **168**: 307-316.
- KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. **Science 208**: 990-1000.

- KULJU, K.K.M.; SIERRA, S.E.C.; VAN WELZEN, P.C. (2007). Re-shaping Mallotus [part 2]: inclusion of *Neotrewia*, *Octospermum* and *Trewia* in Mallotus s.s. (Euphorbiaceae s.s.). **Blumea**, **52**: 115-136.
- LUCENA, M. F. A. 2009. Diversidade de Euphorbiaceae (s. l.) no Nordeste do Brasil. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 197p.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2001. **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade na Amazônia brasileira**. Brasília: MMA/SBF.144p.
- MAFFEI, M. 1996. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. **Biochemical Systems and Ecology** **24**: 53-64.
- MAFFEI, M.; BADINO, S.; BOSSI, S. 2004. Chemotaxonomic significance of leaf wax *n*-alkanes in the *Pinales* (Coniferales). **Journal of Biological Research** **1**: 3-19.
- MAFFEI, M.; MEREGALLI, M.; SCANNERINI, S. 1997. Chemotaxonomic significance of surface wax alkanes in the Cactaceae. **Biochemical Systematics and Ecology** **25**: 241-253.
- MARKSTÄDTER, C.; FEDERLE, W.; JETTER, R.; RIEDERER, M.; HÖLLDOBLER, B. 2000. Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. **Chemoecology** **10**: 33-40.
- MAXZUD, M. K. E ZYDGALO J.A. 1991. Variacion de alcanos foliares em algumas especies argentinas de *solanum* (Solanaceae). **Anales de Biología** **17**: 137-140.
- MEDINA, E.; AGUIAR, G.; GOMEZ, M.; MEDINA, J. D. 2004. Patterns of leaf epicuticular waxes in species of *Clusia*: taxonomical implications. **Interciencia** **29**: 579-582.
- MELO, A.L.D.E; SALES, M.F. 2008. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, **22**: 806-827.

- MERINO, E.F.; MAESTRI, D.M.; PLANCHUELO, A M. 1999. Chemotaxonomic evaluation of leaf alkanes in species of *Lupinus* (Leguminosae). **Biochemical Systematic and Ecology** 27: 297-301.
- MILLER, K.I., WEBSTER, G.L. 1962. Systematic position of *Cnidoscopus* and *Jatropha*. **Brittonia** 14: 174-180.
- MIMURA, M. R. M., SALATINO, M. L. F., SALATINO, A., BAUMGRATZ, J. F. A. 1998. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: taxonomic implications **Biochemical Systematics and Ecology** 26: 581-588,
- MOHY-UD-DIN, A.; KHAN, Z.; AHMAD, M.; KASHMIRI M.A.; YASMIN, S.; ASGHAR, M.N.; AHMAD, S.R. 2010. Epicuticular Waxes from *Solanum nigrum* complex: chemotaxonomic implications. **Asian Journal of Chemistry** 22: 2919-2927.
- MOTTA, L. B; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. 2009. Foliar cuticular alkanes of *Camarea* (Malpighiaceae) and their taxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology** 37: 35-39.
- MUBO, A.; SONIBARE, A.A.; JAYEOLAB, A.E.G. 2005. Chemotaxonomic significance of leaf alkanes in species of *Ficus* (Moraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 33: 79-86.
- MÜLLER, C.; RIEDERER, M. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology** 31: 2621-2651.
- NAZIR, M.; AHMAD, W.; RABI, N.A.; KHAN, S.A.1993.Epicuticular leaf wax of *Euphorbia helioscopia* L.(Euphorbiaceae).**Zeitschrift für naturforschung** C48:5-9.
- PAMIDIMARRI, D.V.N.S., CHATTOPADHYAY, B., REDDY M.P. 2009. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Mol. Biol. Rep.**, 36: 1929-1935.

- RIEDERER, M.; MARKSTÄDTER, C. 1996. Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. In **Plant Cuticles** (ed. G. Kerstiens), **BIOS Scientific Publishers Ltd.**, Oxford, pp. 189-200.
- ROHLF, F. J. 2005. **NTSYS-Pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Setauket: Exeter Software.
- ROMMERSKIRCHEN, F.; PLADER, A. A.; EGLINTON, G.; RULLKÖTTER, Y.; CHIKARAISHIC, J. 2006. Chemotaxonomic significance of distribution and stable carbon isotopic composition of long-chain alkanes and alkan-1-ols in C₄ grass waxes. **Organic Geochemistry** **37**: 1303-1332.
- SALATINO, A.; SILVA, J.B. 1988. Método para separação de constituintes comuns de ceras vegetais por cromatografia em camada delgada. **Bol Bot.**, **10**: 1-6.
- ESCALANTE-EROSA, F.; ORTEGÓN-CAMPOS, I.; PARRA-TABLA, V.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. (2004). Chemical Composition of the Epicuticular Wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. **Rev. Soc. Quím. Méx.**, **48**, 24-25.
- SCORA, G.A., SCORA, R.W. 1999. Epicuticular hydrocarbon composition of gallito (*Pedilanthus macrocarpus*) from Baja California and Sonora, Mexico. **Industrial Crops and Products** **9**: 197-204
- STEVENS, J.F.; HART, H.; BLOCK, A.; ZWAVING, J.H.; MALINGRE, T.M. (1994). Epicuticular wax composition of some European sedum species. **Phytochemistry** **35**: 389-399.
- SUDENE. 1990. *Dados pluviométricos mensais do Nordeste*. Recife, Pernambuco.
- VALLE, L. S. E.; KAPLAN, M. A. C. 2000. "*Sapium glandulatum* COMPLEX" (EUPHORBIACEAE). **An. Acad. Bras. Ciênc.**, **72**: 293-294.
- VERMEER, C.P.; NASTOLD, P.; JETTER, R. 2003. Homologous Very & long & chain 1,3 & alkanediols and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. **Phytochemistry** **62**: 433-438.

WALTON, T.J. 1990. Waxes, cutin and suberin. In **Methods in Plant Biochemistry** (eds J. L. Harwood & J. Boyer), Vol. 4, p. 106–158. Academic Press, London.

WURDACK, K.J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M.W. 2005. Molecular Phylogenetic Analysis Of Uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae Sensu Stricto) Using Plastid Rbcl And Trnl-F Dna Sequences. **American Journal of Botany** **92**: 1397-1420.

Parque nacional do Catimbau. IBAMA. 2007. Disponível em: [HTTP://www.ibama.gov.br/siucweb/mostraUc.php?seq=1438](http://www.ibama.gov.br/siucweb/mostraUc.php?seq=1438). (Acessado em Setembro de 2010).

Capítulo 3

CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE EPICUTICULAR FOLIAR DE ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE DO SEMIÁRIDO (VALE DO CATIMBAU - PE, BRASIL)

CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE EPICUTICULAR FOLIAR DE ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE DO SEMIÁRIDO (VALE DO CATIMBAU - PE, BRASIL)

Resumo

Aspectos micromorfológicos da superfície foliar abaxial e adaxial de 21 espécies de Euphorbiaceae de região semi-árida do Brasil foram investigados por microscopia eletrônica de varredura. A caracterização micromorfológica das ceras epicuticulares revelou diferenças significativas entre as faces adaxiais e abaxiais na maioria das espécies, além de variados tipos morfológicas, tais como superfícies lisas, rugosas, cristais dispersos, estrias paralelas, circulares e assimétricas, plaquetas e estruturas dendríticas. As ceras epicuticulares das espécies de *Croton* apresentaram variados padrões e, na maioria das espécies, a superfície é caracterizada pela abundância de tricomas, que em alguns casos, impossibilitam a visualização da cera. A ocorrência de estrias, flocos, cristais dispersos e ceras amorfas foi evidenciada no gênero. A cera lisa, formando um filme com poucos cristais e tricomas evidentes, caracterizou a superfície de *Jatropha mutabilis*, enquanto *J. ribifolia* e *J. mollissima* apresentaram superfície rugosa com estrias orientadas longitudinalmente. A presença de placas com margens pronunciadas, além de estrias, foi observada nas espécies de *Cnidoscolus*. *Manihot dichotoma*, *Euphorbia heterophylla*, *Microstachys hispida*, *Sapium* sp. e *Stilingia* sp. apresentaram padrões morfológicos com plaquetas membranosas, plaquetas perpendiculares à superfície, estrias cordiformes, crostas amorfas e rosetas de ceras, respectivamente.

Palavras chave: cera epicuticular, superfície vegetal, ultraestrutura

**MICROMORPHOLOGY CHARACTERIZATION OF FOLIAR
EPICUTICULAR SURFACE OF SPECIES OF EUPHORBIACEAE OF SEMI-
ARID (VALE DO CATIMBAU - PE, BRAZIL)**

Abstract

Leaves of 21 Euphorbiaceae species from Brazilian semi-arid had micromorphological aspects of abaxial and adaxial surfaces investigated through scanning electron microscopy. Micromorphological description of epicuticular waxes revealed significant differences between abaxial and adaxial surfaces for most of the sampled species. Furthermore, many morphological types, like smooth, creased, disperse crystals, round, asymmetric and parallel ribs, boards and dendritic structures were found. *Croton* species epicuticular waxes' showed patterns like ribs, flakes, disperse crystals and amorphous waxes, and for most species the surface is noticeably distinguished by an abundance of trichomes, which in some cases prevented waxes from being viewed. The surface of *Jatropha mutabilis* was characterized by a film layer of smooth wax, with few evident crystals and trichomes. *J. ribifolia* and *J. mollissima* showed creased surfaces, with longitudinally-oriented ribs. Aside from ribs, boards with pronounced ends were found in *Cnidoscolus* species. *Manihot dichotoma*, *Euphorbia heterophylla*, *Microstachys hispida*, *Sapium* sp. and *Stilingia* sp. showed, respectively, morphological patterns with membranous boards, boards upright in relation to surface, cordate ribs, amorphous crosts and wax rosettes.

Key words: epicuticular wax, plant surface, ultrastructure

Introdução

A maioria das plantas apresenta uma membrana extracelular contínua denominada cutícula, a qual recobre os órgãos aéreos primários da planta (Koch e Ensikat, 2008). A cutícula consiste, basicamente, de dois componentes hidrofóbicos: uma matriz insolúvel de cutina e ceras solúveis (Kim, 2008). Parte da cera encontra-se incorporada à matriz de cutina, sendo denominada intracuticular, e a parte mais superficial que forma uma película ou filme de cera, denominada cera epicuticular (Holloway, 1982; Walton, 1990).

Sobre o filme de cera pode ocorrer a presença de cristais em forma de filamentos, bastões, plaquetas, túbulos, crostas, estruturas dendríticas e amorfas, podendo a composição química influenciar na morfologia dos cristais (Kolattukudy, 1980; Jetter e Riederer, 1995; Barthlott *et al.*, 1998; Heredia, 2003). Esses cristais epicuticulares apresentam cerca de 1 a 5 μm de comprimento (Baker, 1982; Jeffree, 1986). É comum um padrão morfológico caracterizar um determinado táxon, o que pode ser valioso para a sistemática vegetal (Barthlott *et al.*, 2003). No entanto, pode haver variações em função de fatores como idade da planta, composição química e condições ambientais (Shepherd *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2003; Federle e Rheindt, 2005; Muller e Riederer, 2005).

A morfologia tridimensional dos cristais de cera epicuticular são de particular importância para a maioria das interações interfaciais entre a planta e o ambiente (Koch *et al.*, 2006), podendo, ainda, caracterizar um táxon e explicar relações evolutivas.

Nas últimas décadas, as modernas técnicas de microscopia permitiram o conhecimento de uma grande variedade de microestruturas da superfície externa das plantas, tais como cristalóides e tricomas. Recentemente, as propriedades da superfície cuticular têm servido como modelo para a “biomimética”, técnica que se baseia nas características físico-químicas das ceras, como a superhidrofobicidade e a propriedade auto-limpante (efeito lótus) de superfícies funcionais, como a cutícula vegetal, para a produção de materiais em escala industrial (Koch e Ensikat, 2008; Koch e Barthlott, 2009).

Diante da variedade morfológica dos cristais de cera, algumas classificações foram sugeridas, buscando padronizar a nomenclatura dessas estruturas, sendo as propostas por Barthlott *et al.* (1998) e Jeffre (2006) as mais utilizadas. Barthlott *et al.*

(1998) classificam as ceras em 23 tipos diferentes, com base em caracteres químicos e morfológicos, enquanto Jeffre (2006) classifica as ceras em seis tipos e sugere a divisão em sub-tipos morfológicos e químicos.

Os tipos morfológicos mais comuns são plaquetas e túbulos. Plaquetas foram observadas em espécies de *Triticum*, *Eucalyptus*, *Saccharum*, *Nepenthes*, *Allium*, *Euphorbia* (Jeffree *et al.*, 1975; Haas *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2006). Cristais tubulares foram evidenciados em *Taxus baccata* e *Wollemia nobilis* (Wen *et al.* 2006; Dragota e Riederer, 2007). Cristais amorfos, filmes de cera e grânulos também são citados (Kim, 2008).

Apesar da importância do caráter morfológico das ceras, bem como da representatividade da família Euphorbiaceae, poucas espécies desse grupo foram estudadas até o momento, quanto à micromorfologia das ceras epicuticulares, restringindo-se os estudos, basicamente, às espécies de *Sapium*, *Macaranga*, *Ricinus* e *Euphorbia* (Martin e Juniper, 1970; Federle *et al.*, 1997; Markstädter *et al.*, 2000; Guhling *et al.*, 2005; Guhling *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o presente estudo se propõe a caracterizar morfológicamente as ceras epicuticulares foliares de 21 espécies contidas em oito gêneros ocorrentes em região semi-árida do Nordeste do Brasil e fornecer subsídio auxiliar para delimitação de espécies de Euphorbiaceae, com base nos padrões micromorfológicos das ceras.

Material e métodos

Coleta das espécies

Folhas íntegras e completamente expandidas de indivíduos adultos de *Cnidoscolus pubescens* Pohl, *C. urens* Pohl, *C. vitifolius* (Mill.) Pohl, *C. quercifolius* Pohl, *Croton adamantinus* Müll. Arg., *C. argyrophyllus* Kunth, *C. grewoides* Baill., *C. blanchetianus* Baill., *C. glandulosus* L., *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. urticifolius* Lam., *C. pedicellatus* Kunth, *C. lobatus* L., *Jatropha mollissima* Baill., *J. mutabilis* Baill. e *J. ribifolia* (Pohl) Baill., *Manihot dichotoma*, *Sapium* sp., *Stilingia* sp., *Euphorbia heterophylla* e *Microstachys hispida* foram coletadas e secas em estufa a 40°C. Os espécimes foram identificados pela Dr. Maria de Fátima Araújo Lucena e Dr. Suzene Izídio da Silva e depositados no Herbário UFP (Universidade Federal de Pernambuco)

sob os números 59.793, 56.071, 56.070, 61.076, 56.067, 56.068, 60.186, 59.798, 56.063, 56.065, 57.797, 56.072, 57.798, 57.797, 56.072, 57.798, 59.796, 61.081, 61.088, 59.799 e 56.073, respectivamente.

Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização da micromorfologia de ambas as faces, amostras de 1 cm² foram cortadas na região central de folhas previamente desidratadas em estufa. Não tendo sido utilizado nenhum procedimento de fixação, para preservação da cera. As amostras foram fixadas sobre suportes de alumínio (Stubs) com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20 nm de ouro em metalizador marca Baltec, modelo CED030. Em seguida, o material foi observado em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-840 (Jeol-Japão), empregando-se 15 kV. As melhores imagens foram selecionadas e registradas para posteriores análises. As ceras epicuticulares foram caracterizadas com base na nomenclatura proposta por Barthlott *et al.* (1998), com algumas adaptações.

Resultados

A análise da micromorfologia por das ceras epicuticulares foliares microscopia eletrônica de varredura em 21 espécies contidas em oito gêneros da família Euphorbiaceae, estabelecidas em uma região semiárida do Brasil, indicou o predomínio, em geral, do padrão tipo filme, com poucos cristais evidentes, para a maioria dos indivíduos analisados. No entanto, foram observadas variações, sobretudo entre os gêneros, como também, em relação às superfícies abaxiais e adaxiais para a maioria das espécies.

As espécies de *Croton*, em conjunto, apresentaram maior diversidade de padrões micromorfológicos em relação às demais. A superfície de *Croton adamantinus* foi caracterizada pela presença de placas de ceras amorfas em ambas as faces, além de tricomas abundantes na face abaxial (figs. 1 a,d); *C. blanchetianus* (figs. 1 b,e) apresentou superfície rugosa em ambas as faces, com maior presença de tricomas na face abaxial; *C. pedicellatus* apresentou superfície cuticular revestida com ceras amorfas e alta densidade de tricomas, notadamente, na face abaxial (figs. 1 c,f).

A superfície cuticular de *C. heliotropiifolius* apresentou um aspecto rugoso de, com paredes projetadas e irregulares em ambas as faces (figs. 1 g,j); *C. urticifolius* exibiu superfície formada por uma camada de cera amorfa, ondulada, e com placas aparentemente sobrepostas em ambas as faces (figs. 1 h,k); a cera da superfície abaxial de *C. glandulosus* apresentou superfície irregular, enquanto a face adaxial foi caracterizada pela presença de estrias longitudinais paralelas (figs. 1 i,l).

Croton lobatus apresentou face abaxial com superfície rugosa e proeminente e face adaxial com estrias paralelas e cristais dispersos (figs. 1 m,p); em *C. argyrophyllus* a face abaxial é totalmente coberta por tricomas, enquanto a face adaxial apresentou formações côncavas e cristais dispersos (figs. 1 n,q); ambas as faces de *Croton grewoides* mostraram superfície irregular e cera amorfa, com cristais dispersos na face adaxial (figs. 1 o,r).

O padrão micromorfológico da superfície foliar entre as espécies de *Jatropha* variou de superfícies rugosas em *J. ribifolia* e *J. mollissima* (figs. 2 a-d), até uma superfície lisa e estômatos com a cavidade epistomal preenchidos por cera, em *Jatropha mutabilis* (figs. 2 e,f). Além disso, os tricomas estiveram presentes em *J. ribifolia* e *J. mollissima* e ausentes em *J. mutabilis*. As espécies de *Cnidoscolus* apresentam perfil morfológico semelhante àqueles encontrados nas espécies de *Jatropha*, prevalecendo as superfícies enrugadas, amorfas, e em alguns casos, formando estrias orientadas e paredes proeminentes (figs. 3 a-h).

Manihot dichotoma apresentou a face abaxial caracterizada pela presença de plaquetas membranosas e cristais amorfos cobrindo toda a superfície cuticular (figs. 4 a) e a face adaxial com superfície rugosa (figs. 4 b). *Sapium* sp. apresentou densa camada formada por crostas amorfas, sobrepostas, com margens irregulares na face abaxial, e superfície estriada na face adaxial (Figs. 4 c,d), enquanto *Microstachys hispida* apresentou, na face abaxial (figs. 4e) estrias pronunciadas e, em alguns casos, assumindo aspecto cordiforme em torno dos estômatos. Na face adaxial, as estrias são orientadas longitudinalmente (figs. 4 f).

A superfície cuticular de *Stilingia* sp. se apresentou enrugada em ambas as faces, com a cera formando rosetas em torno dos estômatos na face adaxial (figs. 5 a,b); *Euphorbia heterophylla* apresentou abundância de placas ou plaquetas perpendiculares à superfície cuticular em ambas as faces (figs. 5 c,d).

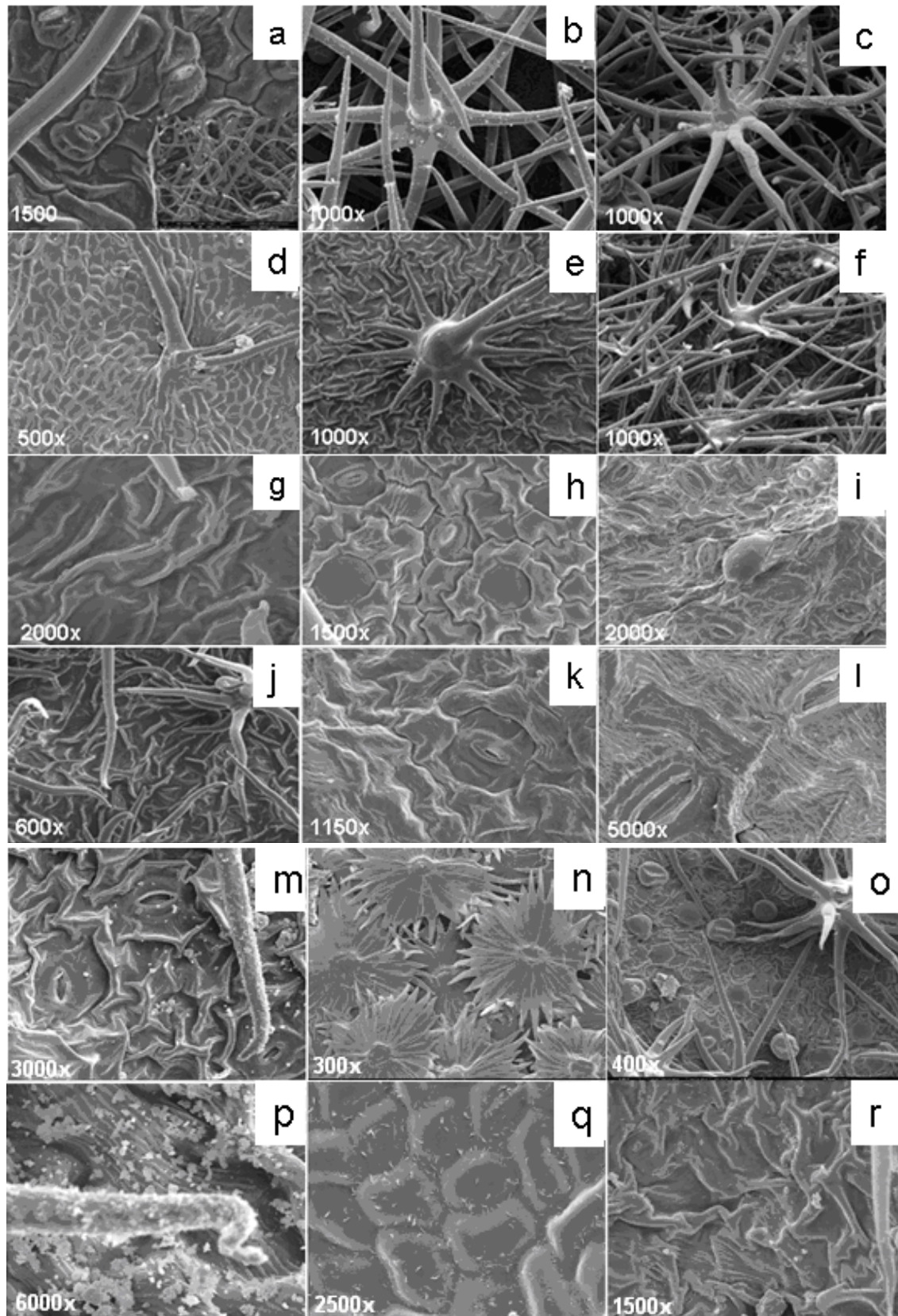


Figura 1. Superfícies foliares abaxiais e adaxiais de espécies de *Croton*: *Croton adamantinus* (a,d), *C. blanchetianus* (b,e), *C. pedicellatus* (c,f), *C. heliotropiifolius* (g,j), *C. urticifolius* (h,k), *C. glandulosus* (i,l), *C. lobatus* (m,p), *C. argyrophyllus* (n,q) e *C. grewoides* (o,r), evidenciando as ceras epicuticulares.

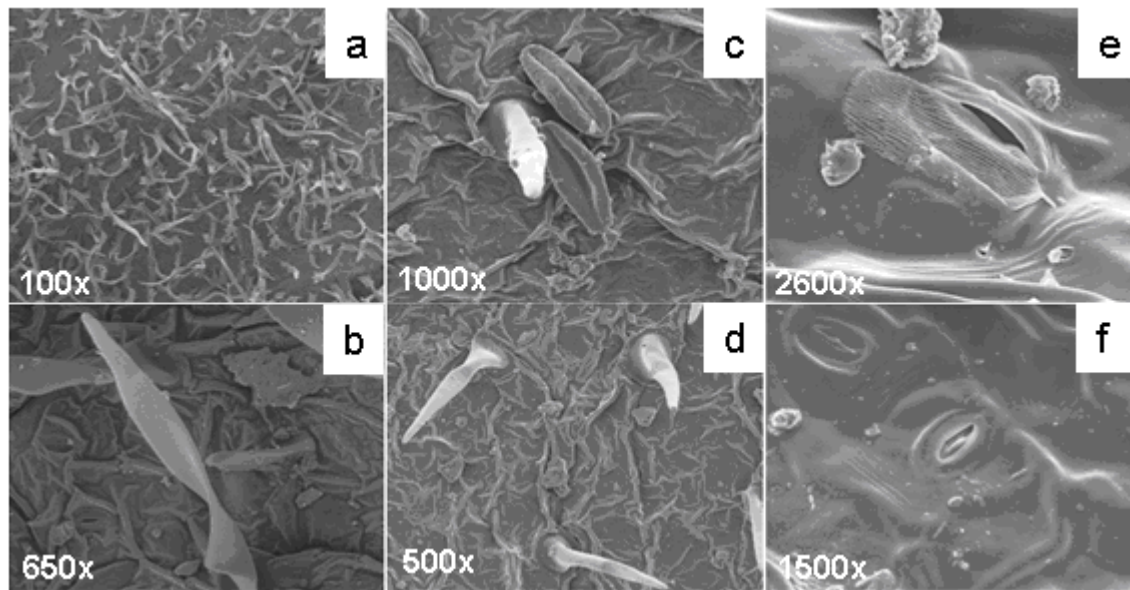


Figura 2. Superfícies foliares abaxiais e adaxiais de espécies de *Jatropha*: *Jatropha mollissima* (a,b), *J. ribifolia* (c,d) e *J. mutabilis* (e,f), evidenciando as ceras epicuticulares.

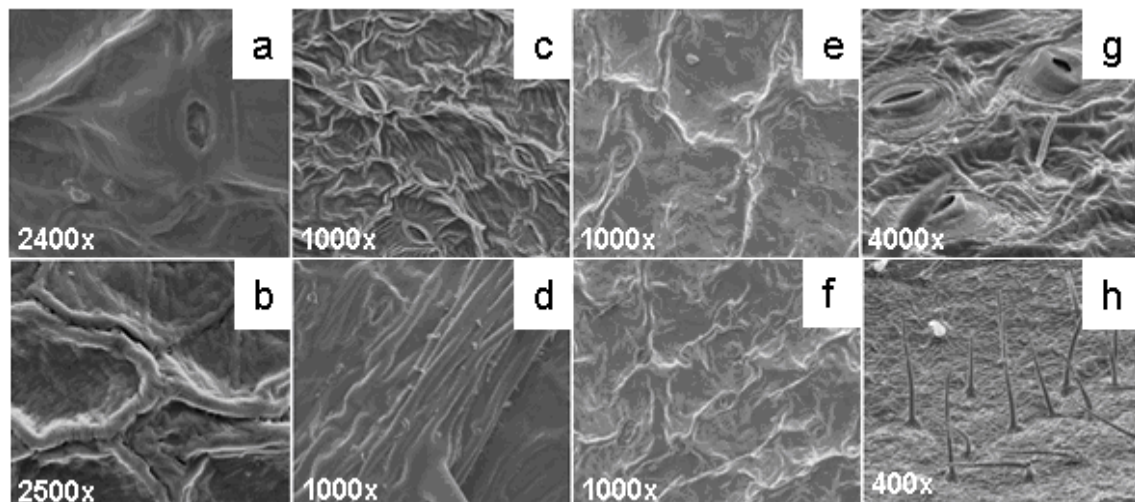


Figura 3. Superfícies foliares abaxiais e adaxiais de espécies de *Cnidoscolus*: *Cnidoscolus urens* (a,b), *C. vitifolius* (c,d), *C. quercifolius*(e,f) e *C. pubescens* (g,h), evidenciando as ceras epicuticulares.

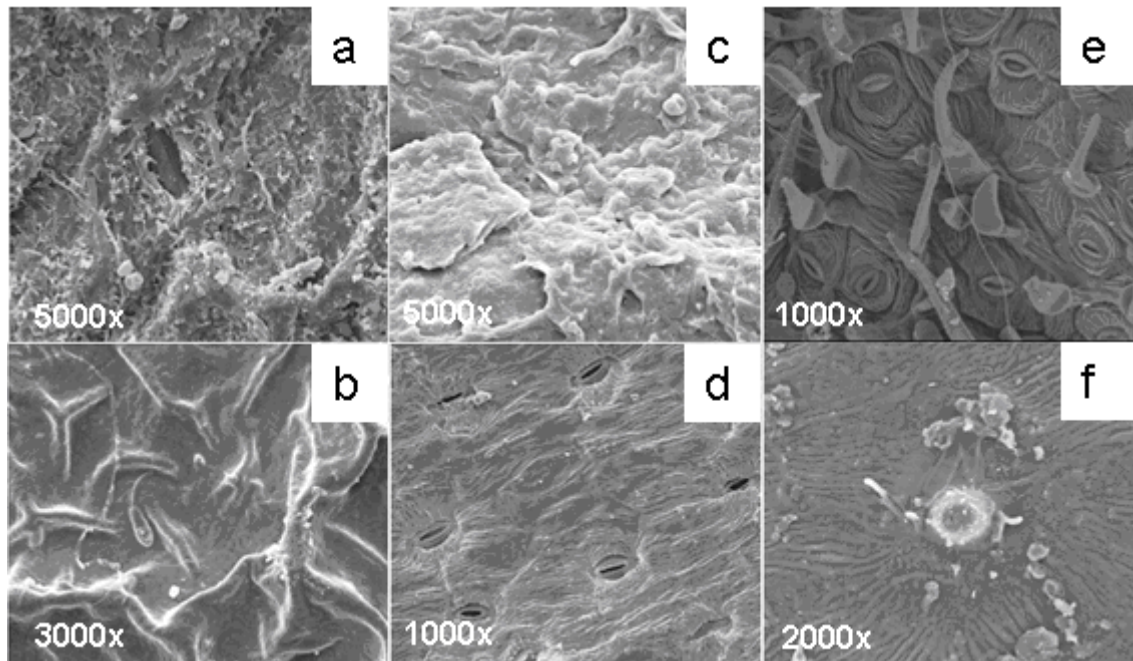


Figura 4. Superfícies foliares abaxiais e adaxiais de *Manihot dichotoma* (a,b), *Sapium* sp. (c,d) e *Microstachys hispida* (e,f), evidenciando as ceras epicuticulares.

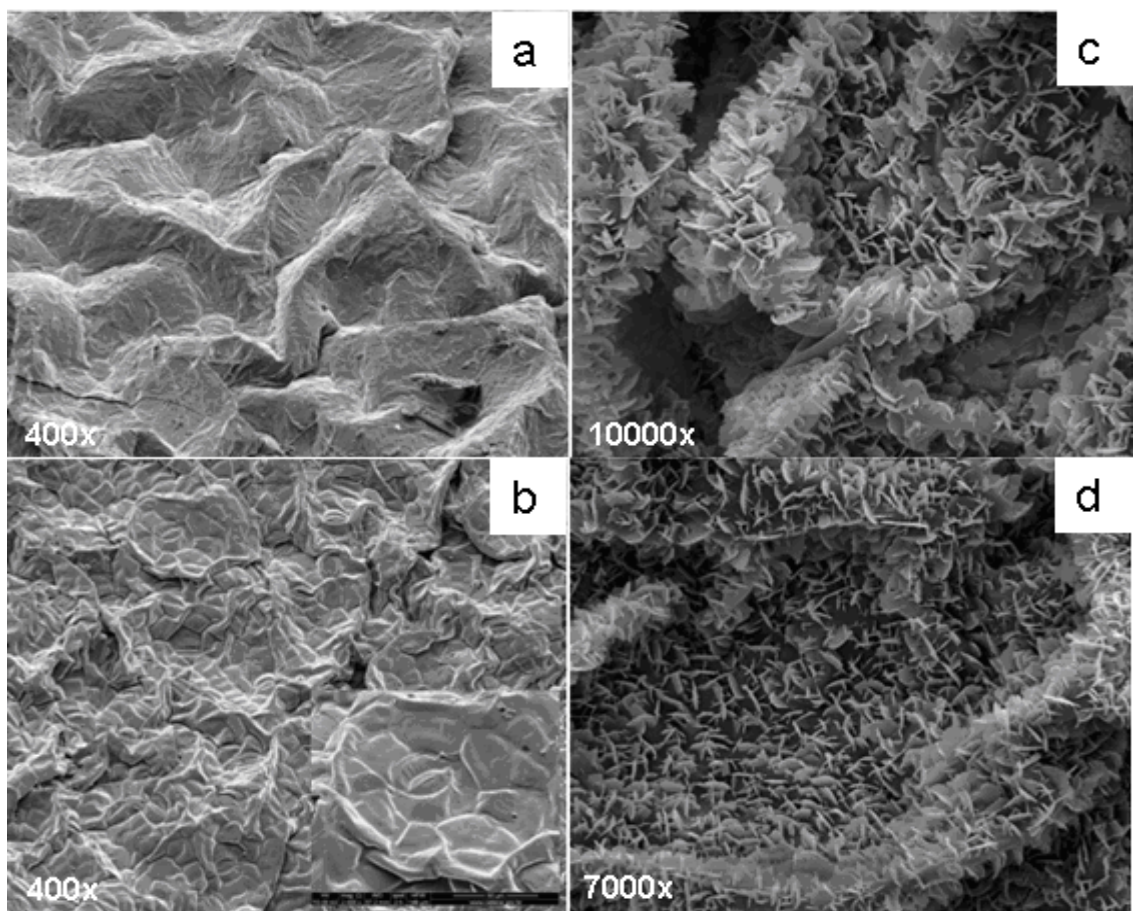


Figura 5. Superfícies foliares abaxiais e adaxiais de *Stilingia* sp (a,b) e *Euphorbia heterophylla* (c,d), mostrando as ceras epicuticulares das faces abaxial e adaxial, respectivamente.

Discussão

A ocorrência do padrão filme pode representar uma resposta química das plantas dessas plantas, às variáveis ambientais, pois em locais com restrição hídrica e sob temperaturas elevadas, como o semiárido do Brasil, os *n*-alcanos, juntamente com os triterpenos alcoólicos assumem importante papel no controle da transpiração, devido ao maior caráter hidrofóbico que conferem às ceras vegetais (KERSTIENS, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As ceras das espécies de *Croton* exibiram superfícies cuticulares com variados padrões morfológicos, como também em relação à forma e abundância dos tricomas, presentes, sobretudo, na face adaxial. Estudos relacionados com a ultraestrutura das ceras epicuticulares nessas espécies, e no gênero, não foram relatados. No entanto, a abundância e diversidade de tricomas observada em espécies de *Croton*, já havia sido reportada por Webster *et al.* (1996). Lucena & Sales (2006) estudando a superfície foliar de 14 espécies de *Croton*, encontraram variados padrões morfológicos dos tricomas foliares.

O padrão de cera da face adaxial de *J. mollissima* assemelha-se ao observado por Olowokudejo (1993) nas espécies africanas *J. neriifolia* (Nigéria) e *J. kamerunica* (Senegal). Por outro lado, a micromorfologia exibida por *Manihot dichotoma* diferiu da observada por Zinsou *et al.* (2006) em *Manihot esculenta*.

As espécies de *Cnidoscolus* e *Jatropha* apresentaram padrões de cera semelhantes, predominando superfícies moderadamente onduladas e com poucos tricomas. Representantes dos gêneros *Manihot*, *Sapium*, *Microstachys*, *Stilingia* e *Euphorbia* apresentaram variada ornamentação, como cristais amorfos, estrias, formas dendríticas e plaquetas, respectivamente. Neinhuis & Barthlott (1997) citam a presença de plaquetas na superfície de *Euphorbia amygdaloides*, *E. characias*, *E. epithymoides*, *E. esula*, *E. myrsinitis*, *E. obtusifolia* e *E. rigida*, resultados confirmados por KOCH *et al.* (2009), que além de plaquetas, detectaram a presença de filmes de cera na superfície de *E. characias* (L.) e *E. lathyris* (L.).

Recentemente, Kulshreshtha e Ahmed (2008), estudando a micromorfologia das ceras de 16 espécies, distribuídas em 13 gêneros de Euphorbiaceae, identificaram variados tipos morfológicos (grânulos, placas, cristais em forma de fita, haste, crosta, cristais agregados), predominando grânulos finos e placas cristalóides, porém em várias espécies a cera se apresentou escassa ou imperceptível.

Em conclusão, o presente estudo permitiu o conhecimento da micromorfologia cuticular foliar de 21 espécies de Euphorbiaceae do semiárido brasileiro, de forma inédita. Os diversos padrões micromorfológicos observados podem permitir a caracterização de alguns taxa dessa complexa família. Os variados padrões micromorfológicos das ceras epicuticulares mostrados pela primeira vez por microscopia eletrônica, através desse estudo, podem ser úteis para caracterizar algumas dessas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, E.A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. (Eds.) **The plant cuticle**. London: Academic Press, 140-161.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society** **126**: 237-260.
- BARTHLOTT, W.; THEISEN, I.; BORSCH, T.; NEINHUIS, C. (2003). Epicuticular waxes and vascular plant systematics: integrating micromorphological and chemical data. In: Stuessy, T.F., E. Hörnagl & V. Mayer (eds.): **Deep Morphology: Toward a renaissance of morphology in plant systematics**, Regnum Vegetabile 141, 189-206. Gantner Verlag, Rugell, Liechtenstein
- DRAGOTA, S.; RIEDERER, M. (2007). Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: morphology and chemical composition. **Annals of Botany** **100**: 225-231.
- FEDERLE, W.; RHEINDT, F. E. (2005). *Macaranga* ant-plants hide food from intruders: correlation of food presentation and presence of wax barriers analysed using phylogenetically independent contrasts. **Biological Journal of the Linnean Society** **84**: 177-193.
- FEDERLE, W.; MASCHWITZ, U.; FIALA, B.; RIEDERER, M.; HOLDOBLER, B. (1997). Slippery Ant & plants and Skiful climbers: Selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). **Oecologia** **112**: 217-224.
- GUHLING, O; HOBL, B; YEATS, T; JETTER, R. (2006). Cloning and characterization of a lupeol Synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. **Elsevier Science Inc.**, **448**: 60-72.
- GUHLING, O; KINZLER, C.; DREYER, M.; BRINGMANN, G.; JETTER, R. (2005). Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2325-2343.
- HAAS, K. (2001). Components with unusual long chains in the epicuticular wax of *Kalanchoe scapigera*. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** **372**: 531.

- HEREDIA, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta** **1620**: 1-7.
- HOLLOWAY, P.J. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In DF Cutler, KL Alvin, CE Price, eds, **The Plant Cuticle**, Linnean Society Symposium Series, Vol 10. **Academic Press**, London, pp 1-32.
- JEFFREE, C.E.; BAKER, E.A.; Holloway, P.J. (1975). Ultrastructure and recrystallisation of plant epicuticular waxes. **New Phytologist** **75**: 539-549.
- JEFFREE, C.E. (1986). The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: Juniper BE, Southwood SR, eds. **Insects and the plant surface**. London: Edward Arnold, pp.23-63.
- JEFFREE, C.E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer, M & Müller, C. (eds.). **Biology of the Plant Cuticle**. Blackwell Publishing. pp.11-125.
- JETTER, R.; RIEDERER, M. (1995). In vitro reconstitution of epicuticular wax crystals – formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols. **Botanica Acta** **108**: 111-120.
- KERSTIENS, G. (1996) Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure–function relationships. **Trends in Plant Science** **1**: 125-129.
- KIM, K.W. (2008). Visualization of micromorphology of leaf epicuticular waxes of the rubber tree *Ficus elastica* by electron microscopy. **Micron** **39**: 976-984.
- KOCH, K.; BARTHLOTT, W. (2009). Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. **Phil. Trans. R. Soc. A** **367**: 1487-1509.
- KOCH, K.; HARTMANN, K.D.; SCHREIBER, L.; BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. (2006). Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. **Environmental and Experimental Botany** **56**: 1-9.
- KOCH, K., ENSIKAT, H. (2008). The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. **Micron** **39**: 759-772.
- KOCH, K.; BHUSHAN, B.; ENSIKAT, H.J.; BARTHLOTT, W. (2009). Self-healing of defects in the wax coating on living plant surfaces and a new specimen preparation method for atomic force microscopy. **Phil. Trans R. Soc. A** **367**: 1673-1688.

- KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. **Science** **208**: 990-1000.
- KULSHRESHTHA, K.; AHMED, K. J. (2008). SEM studies of foliar epicuticular wax morphology in some taxa of Euphorbiaceae. **Feddes Repertorium** **104**: 361-370.
- LUCENA, M.F. A.; SALES, M.F. (2006). Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Rodriguésia** **57**: 11-25.
- MARKSTÄDTER, C.; FEDERLE, W.; JETTER, R.; RIEDERER, M.; HÖLLDOBLER, B. (2000). Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. **Chemoecology** **10**: 33-40.
- MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. (1970). **The Cuticles of Plants**. London: Edward Arnold.
- MÜLLER, C.; RIEDERER, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2621-2651.
- NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. (1997). Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annals of Botany** **79**: 667-677.
- OLIVEIRA, A.F.M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **75**: 431-439.
- OLOWOKUDEJO, J.D. (1993). Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **111**: 139-154.
- RIEDEL, M.; EICHNER, A.; JETTER, R. (2003). Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. **Planta**. v. 218, p.87-97.
- SHEPHERD, T.; ROBERTSON, G.W.; GRIFFITHS, D.W.; BIRCH, A.N.E.; DUNCAN, G. 1995. Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. **Phytochemistry** **40**: 407-417.
- WALTON, T.J. 1990. Waxes, cutin and suberin. J. L. Harwood & J. Boyer (eds.). In **Methods in Plant Biochemistry**. Vol. 4, p. 106-158. **Academic Press**, London.
- WEBSTER, G.L., DEL-ARCO-AGUILAR, M.J.; SMITH, B.A. (1996). Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **121**: 41-57.

WEN, M.; BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. (2006). Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. **Phytochemistry** **67**: 1808-1817.

ZINSOU, V.; WYDRA, K.; AHOHUENDO, B.; SCHREIBER, L. (2006). Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to *Xanthomonas* blight. **Euphytica** **149**: 189-198.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se diversos aspectos envolvendo a Família Euphorbiaceae abordados nesse estudo, destaca-se que:

- A relação de espécies de Euphorbiaceae com galhadores revelou uma grande diversidade de preferências por parte dos insetos, uma vez que algumas espécies apresentaram forte frequência de galhas foliares e ou caulinares, enquanto em outras não foi registrada a ocorrência de galhas durante todo o período estudado. *Cnidoscolus* spp. e *Croton* spp. foram as mais galhadas, enquanto as espécies de *Jatropha* não apresentaram ocorrência de galhas.
- Apesar de a literatura referir a possível influência da fitofisionomia sobre insetos galhadores, acredita-se que a riqueza das plantas hospedeiras específicas nas diferentes áreas de observação no PARNA do Catimbau, foi o principal determinante da riqueza de galhadores associados às espécies estudadas, ressaltando a especificidade da relação inseto galhador-planta hospedeira
- Análises do perfil químico dos *n*-alcanos das ceras epicuticulares foliares de 15 espécies de Euphorbiaceae, com poucas exceções, mostraram o predomínio de nonacosano (C29) nas espécies de *Croton* e untriacontano (C31) entre as espécies de *Jatropha* e tritriacontano (C33) entre as espécies de *Cnidoscolus*.
- Nítidas diferenças no padrão de distribuição dos *n*-alcanos, permitiram caracterizar e agrupar a maioria das espécies em seus respectivos gêneros, o que permite sugerir o uso dessa classe de compostos como ferramenta taxonômica adicional.
- A variada micromorfologia da superfície cuticular em Euphorbiaceae, permite caracterizar alguns grupos, podendo auxiliar à taxonomia desta família.

4. RESUMO

Há aproximadamente 460 milhões de anos, as plantas desenvolveram uma camada protetora hidrofóbica, imprescindível à sobrevivência no ambiente terrestre, a cutícula. Essa membrana cobre a superfície dos órgãos aéreos da maioria das plantas e é formada basicamente por uma matriz de cutina associada a lipídios denominados ceras cuticulares. As ceras integradas à matriz de cutina são conhecidas como intracuticulares enquanto as sobrepostas à cutícula, são chamadas ceras epicuticulares. Mais superficialmente é comum a presença de cristais de cera, cuja a variada morfologia é influenciada pela composição química. Do ponto de vista químico, as ceras são misturas complexas de compostos alifáticos de cadeias longas como *n*-alcanos, ácidos graxo, alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas, e compostos cíclicos como triterpenos e flavonóides, porém a composição pode variar em função de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Sendo a superfície mais externa, a cutícula se constitui em interface da planta com o ambiente, participando ativamente das diversas interações com o meio. Entre as diversas funções da cutícula estão a proteção mecânica, o controle da perda de água por transpiração, proteção da radiação solar excessiva, proteção contra microrganismos e poluentes, além de servir de substrato para diferentes interações com insetos herbívoros, entre os quais, os insetos indutores de galhas, que estabelecem uma íntima relação com o tecido cuticular. Euphorbiaceae é uma família de grande importância, sobretudo nos trópicos, sendo caracterizada pela diversidade morfológica e pelo amplo espectro de compostos químicos de seus representantes. Por outro lado essa diversidade da família gera problemas taxonômicos e vários métodos tem sido utilizados na tentativa de resolvê-los. O uso das propriedades químicas e morfológicas das ceras epicuticulares tem sido empregado com relativo sucesso na sistemática. Nesse estudo, foi investigada uma das principais classes químicas das ceras, os *n*-alcanos e testado seu potencial quimiotaxonômico. O perfil químico dos *n*-alcanos de 15 espécies, obtido por GC-MS, mostrou o predomínio dos homólogos ímpares, e análises da ultraestrutura de 21 espécies através de MEV revelou padrões variados. Foi realizado ainda um levantamento da frequência de galhas em espécies de Euphorbiaceae do Parque Nacional do Catimbau-PE. Observações sobre os insetos galhadores em quatro diferentes áreas do PARNA do Catimbau, mostrou alta frequência destes insetos em algumas espécies, enquanto em outras não foi registrada essa interação.

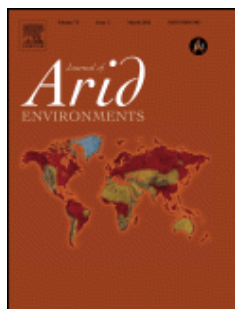
5. ABSTRACT

About 460 million years ago, plants developed the cuticle, a protective hydrophobic layer essential for their survival on solid ground. This membrane covers the surface of the aerial organs in the majority of plants and is basically composed of a cutine matrix in association with lipids called cuticular waxes. Waxes that are integrated into the cutine matrix are known as intracuticular, while waxes that are overlapped with the cuticle are called epicuticular waxes. The presence of wax crystals over the outer surface is common, and their wide morphological range is influenced by chemical composition. From the chemical point of view, waxes are complex mixtures of long-chain aliphatic compounds, fatty acids, alcohols, esters, aldehyds, ketones, and cyclic compounds like triterpenes and flavonoids, but the composition may vary in function of many intrinsic and extrinsic factors. Being the most external surface, cuticle represents the interface of plants with their environment, taking active part in the many interactions with it. Some of the many functions presented by the cuticle are mechanical protection, mediation of water loss through transpiration, protection from excessive solar radiation and protection against microorganisms and pollutants. It also acts as substrate for the interaction with herbivore insects and gall inducers, which establish an intimate relation with the cuticular tissue. For its great morphological diversity and wide range of chemical compounds, Euphorbiaceae is a family of great importance in the Tropics. On the other hand, this very same diversity generates taxonomical problems, and many methods have been used in attempt to solve them. The use of chemical and morphological properties has been employed with relative success in plant systematics. In this study, we investigated and tested the chemotaxonomical potential of one of the main classes of the waxes, the *n*-alkanes. The chemical profile of the *n*-alkanes from 15 species, obtained through GC-MS, showed the dominance of odd homologues, while ultrastructure analysis of 21 species through SEM revealed distinct patterns. We also conducted a research on frequency of galls seen in Euphorbiaceae species from Catimbau National Park (Pernambuco, Brazil). Observations about gall inducers in four different areas of the National Park showed a high frequency of these insects in some species, while other species did not show this interaction at all.

ANEXOS

Journal of Arid Environments

Guide for Authors



ISSN: 0140-1963

Imprint: ELSEVIER



Introduction

Types of paper

Research Articles: reporting original and previously unpublished work. Research papers have a reference limit of 50 cites

Short Communications: These are concise, but complete descriptions of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Examples include descriptive research on seed-germination conditions, plant responses to salinity, animal feeding habits, etc. Short communications have a reference limit of 20 cites

Short communications should not exceed 2400 words (six printed pages), excluding references and legends. Submissions should include a short abstract not exceeding 10% of the length of the communication and which summarizes briefly the main findings of the work to be reported. The bulk of the text should be in a continuous form that does not require numbered sections such as Introduction, Materials and methods, Results and Discussion. However, a Cover page, Abstract and a list of Keywords are required at the beginning of the communication and Acknowledgements and References at the end.

These components are to be prepared in the same format as used for full-length research papers. Occasionally authors may use sub-titles of their own choice to highlight sections of the text. The overall number of tables and figures should be limited to a maximum of three (i.e. two figures and one table).

Review Articles: Critical evaluation of existing data, defined topics or emerging fields of investigation, critical issues of public concern, sometimes including the historical development of topics. Those wishing to prepare a review should first consult the

Editors or Associate Editors concerning acceptability of topic and length.

Think Notes: Short, one page notes describing new developments, new ideas, comments on a controversial subject, or comments on recent conferences will also be considered for publication.

Letter to the Editor: A written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of new insights on the particular topic, relevance to the published paper and timeliness.

Contact details for submission

Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office at jae@elsevier.com.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive*

86/609/EEC for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published

previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing

Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at

<http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process.

Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. It is required that potential referees not be from the same institution as the authors. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Use correct, continuous line numbering throughout the document.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address.

Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Plant names

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

✉ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-electronic artwork

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless

of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Regular research papers have a reference limit of 50 cites and short communications should not exceed 20 cites.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a

source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).

Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Please note that Journal names and references should be provided in full.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at  <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at  <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves.

Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from  <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



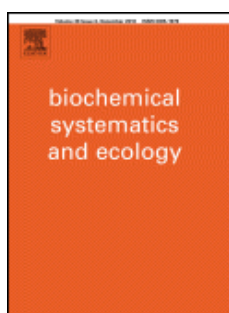
Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission

where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

Biochemical Systematics and Ecology

Guide for Authors



ISSN: 0305-1978

Imprint: ELSEVIER



Introduction

Biochemical Systematics and Ecology is devoted to the publication of original papers and reviews, both submitted and invited, in two subject areas: (i) the application of biochemistry to problems relating to systematic biology of organisms (biochemical systematics); (ii) the role of biochemistry in interactions between organisms or between an organism and its environment (biochemical ecology).

Types of paper

Contributions will be accepted in English as Reviews, Research Papers or New Source Reports. Reviews which survey important and developing areas of biochemical systematics and ecology are encouraged but authors are advised to consult the Editor before preparing such articles. Research papers should generally be of completed investigations. Preliminary reports will be published where findings are considered to be of sufficient interest to justify rapid publication. In addition, short reports of new sources of known compounds (New Source Reports) will be accepted where they can be justified in terms of systematic or ecological significance. These reports must be written

to a standard format (see below). Papers will be grouped in each issue according to subject area.

Biochemical Systematics and Ecology welcomes suitable books for review. Please send sample copies to the Editor-in-Chief.

NEW SOURCE REPORTS

New source reports are designed to allow the report of known metabolites with *bona fide* systematic or ecological interest from a new biological source. Material for this section will be refereed with the same rigour as research papers. New source reports must be written to a strict format and have a maximum size of two printed pages in the journal. The format consists of: (i) Title (max.12 words), (ii) Authors, (iii) Addresses, (iv) Keywords (max.6 words), (v) Subject and source - description of subject species and its validation, (vi) Previous work, (vii) Present study - the results to be reported, (viii) Chemotaxonomic (or Ecological) significance - justification for publication, (ix) Acknowledgements, (x) References - abbreviated forms without titles for papers and with just the first page number.

Authors submitting New Source Reports are required to send all information necessary to confirm the identity of the compounds being reported. This should include copies of original spectroscopic data (e.g. UV, MS, NMR) for new and uncommon compounds.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or

academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative

works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing

after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via  <http://ees.elsevier.com/bse/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:  <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date**

by the corresponding author.

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

See http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/nomenclature.pdf

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For**

color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for

color in print or on the Web only. For further information on the preparation of

electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (☞ <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (☞ <http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).
Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New

York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations:  <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations:  <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service):  <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at  <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound

clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves.

Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from  <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately.

Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent

corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



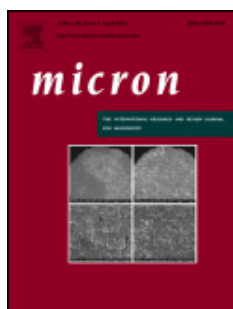
Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

Micron

The International Research and Review Journal for Microscopy

Guide for Authors



ISSN: 0968-4328

Imprint: ELSEVIER



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication

see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow

the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:  <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations

and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be

able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See  <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

✉ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may

be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (⇒ <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (⇒ <http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).

Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted

chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead

of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves.

Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from  <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please

list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.