

CYNTHIA HERING RINNERT

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOLHA DE *SENNA*
MULTIJUGA SUBSP. *LINDLEYANA* (GARDNER) H.S.
IRWIN & BARNEBY (LEGUMINOSAE,
CAESALPINOIDEAE) E LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DE
COMPOSTOS COM AÇÃO BIOLÓGICA DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE na Área de
Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

São Paulo

2010

CYNTHIA HERING RINNERT

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOLHAS DE *SENNA*
MULTIJUGA SUBSP. *LINDLEYANA* (GARDNER) H.S.
IRWIN & BARNEBY (LEGUMINOSAE,
CAESALPINOIDEAE) E LOCALIZAÇÃO *IN SITU* DE
COMPOSTOS COM AÇÃO BIOLÓGICA DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE na Área de
Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. SOLANGE CRISTINA MAZZONI-VIVEIROS

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Hering-Rinnert, Cynthia

H546a Análise estrutural de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinoideae) e localização *in situ* de compostos com ação biológica de interesse farmacológico / Cynthia Hering Rinnert -- São Paulo, 2010.

99 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Anatomia vegetal. 2. Histoquímica. 3. Fitoquímica. I. Título

CDU: 581.4

Se ao escalar uma montanha na direção de uma
estrela, o viajante se deixa absorver demasiado
pelos problemas da escalada, arrisca-se a
esquecer qual é a estrela que o guia.

Antoine de Saint-Exupéry

Àquelas que, com sua força e
perseverança, nortearam minha vida:
Irma Hering (*in memoriam*), Yara
Koehler Hering e Irmã Ilze Mees

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio recebido através do Projeto "Distribuição sazonal e caracterização estrutural de alcalóides em espécies de *Senna*" (Processo 484411/2006-3), sob a responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young, do Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao Programa de Qualificação Docente (PQD) da UNIVILLE (Universidade da Região de Joinville), pela bolsa e incentivo à realização deste doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, do Instituto de Botânica de São Paulo, nas pessoas de Dra. Vera Lúcia R. Bononi, Dra. Sonia Dietrich, Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros e Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro.

Ao Núcleo de Pesquisa em Anatomia por oportunizar meu treinamento e aprendizado, bem como a realização de várias etapas deste trabalho.

Aos Departamentos de Engenharia Ambiental, Farmácia e Pedagogia (UNIVILLE), nas pessoas dos Chefes de Departamento, Professores Abílio Lenzi e Sandra Medeiros, Luciano Soares, Gilmar Erzinger, Bianca Ramos Pezzini e Roseneide Campos Deglmann, Fabíola Possamai e Sônia Pereira, por flexibilizarem meus horários, facilitando as inúmeras viagens à São Paulo.

Ao convênio DAAD-FAPESC (Deutscher Akademischer Austausch Dienst – Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina), por oportunizar o estágio na Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg (Alemanha).

A Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, na pessoa do Dr. Wolfgang Kreis, por aceitar meu estágio e realização de consistente revisão de literatura junto ao Departamento de Farmácia daquela instituição.

À Dra. Sonia Dietrich, por gentilmente me abrigar em sua residência durante as etapas de seleção para o doutorado.

À Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, pela orientação fornecida no desenvolvimento desta tese.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Márcia Regina Angelo, pela cordialidade e gentileza com que atendeu meus muitos pedidos de documentos e cópias.

Às Dras. Maria Cláudia Marx Young e Elaine Monteiro Cardoso Lopes pelas sugestões e constante incentivo.

À Dra Jane Kraus pelas poucas, mas extremamente importantes conversas sobre metodologia que tivemos.

A Poliana Ramos Cardoso, pelo auxílio e sugestões na preparação das técnicas histoquímicas e de epifluorescência.

A Camila Malone e ao Kleber R. Santos, por me auxiliarem junto ao microscópio de epifluorescência.

Ao Sr. Edmilson V. da Silva, motorista da grua com a qual realizei as coletas, pelo bom humor e solicitude com que sempre me atendeu.

Ao doutorando Marcelo R. Silva, pela companhia e auxílio nas coletas.

À querida técnica Maria Manoel, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela paciência, carinho, auxílio e gostosuras com que sempre me tratou.

A Andrea Nunes Vaz Pedroso, Elisa Mitsuko Aoyama e Fernanda Tresmonti, pelo carinho, amizade, apoio, importantes *brainstorms* e muitas risadas (e lágrimas também) durante nosso convívio.

A Katya Patekoski, pelas orações para que eu sobrevivesse à tese.

A Fernanda Karstedt, Camila Malone e Talita Amador, pelo convívio afetuoso e trocas de idéias.

A todo o pessoal do alojamento (sintam-se **todos** incluídos), pelo convívio carinhoso e divertido ao longo desses quatro anos.

Às queridas amigas Karin Esemann de Quadros, Lúcia Sevegnani e Rosete Pescador, por me mostrarem que a jornada é possível.

Ao amigo Jotham Ziffer Berger, por ter tornado tão acolhedora a estadia na Alemanha.

Ao amigo Luciano Soares, por tantas e tão importantes conversas sobre fitoquímica, desenho experimental e métodos.

À amiga Karin Esemann de Quadros, pelas intermináveis e valiosas correções dos textos produzidos e sugestões.

À minha prima Deborah C. Schrappe Moraes, pela solicitude e auxílio na tradução do resumo.

À querida Fabíola Schwartz, secretária do Departamento de Farmácia da UNIVILLE, pela paciência e solicitude com que sempre atendeu a meus incontáveis pedidos.

À técnica do Laboratório de Farmacognosia da UNIVILLE, Maraike Lubawsky, por auxiliar no preparo de inúmeros reagentes, mesmo fora do horário de expediente.

Aos acadêmicos do curso de Farmácia, Camila Aguiar, Iara C. Schmucker, Aline Teixeira, Jonas Fugazza e Layzon Antonio Lemos da Silva, por me auxiliarem a solucionar tantos pequenos e não menos importantes desafios em fitoquímica.

Ao Sr. Vilson Fernandes, Sr. Aldemir Beninca, Sr. José N. Rodrigues e Sr. Enio J. da Silva, da Área de Manutenção da UNIVILLE, por providenciarem os incontáveis bloquinhos de madeira que usei como base para fixar as amostras de material em Paraplast.

À prof^a Dra. Andréia Schneider, chefe da Área de Pesquisa da UNIVILLE, por autorizar a abertura da “porta” e ao Sr. Paulo Freitas pela instalação hidráulica no laboratório onde desenvolvi a maior parte dos testes histoquímica desta tese, na UNIVILLE.

Ao prof. Raphael Schmitz da Silva, do curso de Design da UNIVILLE, por editar as ilustrações e ao técnico em informática da UNIVILLE, Ricardo Lucas da Silva, pelo auxílio na preparação da arte final desta tese.

Às minhas queridas bolsistas Daniele Karini Pereira e Joziane Gomes Luiz, pelo importante auxílio durante a execução das etapas de pesquisa desenvolvidas na UNIVILLE.

Aos meus familiares (pais, irmãos, esposo e filhos), de quem tanto tempo de convívio roubei, pela paciência e incentivo ao longo dessa caminhada.

OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A família Leguminosae Juss. (subfamília Caesalpinioideae DC.).....	3
1.2. O gênero <i>Senna</i> Mill.....	5
1.3. A espécie <i>Senna multijuga</i> subsp. <i>lindleyana</i> (Gardner) H.S. Irwin & Barneby.....	6
1.4. Pesquisa de novos fármacos.....	8
1.5. Compostos secundários em plantas.....	10
1.5.1. Terpenos.....	12
1.5.2. Compostos fenólicos.....	12
1.5.3. Compostos nitrogenados.....	14
1.6. Análises fitoquímica e histoquímica.....	14
1.7. Análise estrutural.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Coleta.....	24
3.2. Processamento do material.....	25
3.3. Análise estrutural.....	25
3.4. Análise histoquímica.....	26
3.5. Análise fitoquímica.....	28
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Folíolos.....	32
4.2. Ráquis e pecíolo.....	36
4.3. Estrutura secretora.....	38
4.4. Análise fitoquímica.....	39
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

7. RESUMO.....	70
8. ABSTRACT.....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Foto da autora.....22

Figura 2. Fluxograma representativo do processamento ao qual foram submetidas as amostras de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.....24

Figura 3. Fluxograma representativo da análise fitoquímica preliminar à qual foram submetidas as amostras de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.....28

Prancha 1.....31

Figuras 4-14. Etapas da coleta e processamento das amostras. 4. Espécime de *Senna multijuga*. 5-6. Ramos. 6. Ramo subdividido em região basal, mediana e apical. 7. Folíolos basais (A), medianos (B), apicais (C), ráquis (D) e folíolo subdividido em região apical, mediana e basal (E). 8. Fixação das amostras com submissão à bomba a vácuo. 9. Armazenamento. 10-11. Material emblocado em paraplast para seccionamento. 12. Micrótomo de rotação e seccionamento das amostras. 13. Distensão das secções em placa aquecedora. 14. Lâminas prontas em laminário.

Prancha 2.....41

Figuras 15-20: folíolos de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*. Branco e controles negativos para alcalóides, polissacarídeos e flavonóides. 15. Ao natural. 16-17. Branco. 18-20. Controles negativos. 15-16, 18-20. Secções a mão livre. 17. Secção ao micrótomo. 15, 20. Material fresco. 16, 18-19. Material fixado em FNT. 17. Material fixado em FAA e emblocado em paraplast. 18. Controle negativo para alcalóides. 19. Controle negativo para polissacarídeos. 20. Controle negativo para flavonóides.

Prancha 3.....42

Figuras 21-26: folhas e folíolos de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*. 21, 24. Aspectos morfológicos das folhas. 22-23, 25. Folíolos diafanizados em vista frontal. 26. Secção transversal de material fixado em sulfato ferroso e formalina. 21. Estruturas secretoras (círculos). 22. Ápice mucronado curvo. 23. Padrão de nervação da borda foliolar. 24. Base assimétrica de folíolo jovem (seta). 25. Aspecto frontal da domácia. 26. Animal no interior da domácia (seta). 21. Material *in vivo*. Fixação. 22-25. FAA. 26. SFF. Coloração. 21-22, 24, 26. Ao natural. 23, 25. Safranina e azul de Astra.

Prancha 4.....43

Figuras 27-32. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Epiderme e estômatos. 27, 32. Secções transversais. 28-31. Secções paradérmicas. 27. Aspecto da lâmina foliolar evidenciando a epiderme das superfícies adaxial e abaxial do folíolo (setas) e estômato (asterisco). 28. Epiderme da superfície abaxial com estômatos. 29. Epiderme da superfície adaxial. 30-31. Estômatos paracíticos e anisocíticos. 32. Aspecto da epiderme na superfície adaxial do folíolo evidenciando idioblasto com conteúdo (asterisco). Coloração: 27-31. Safranina e azul de Astra. 32. Safranina.

Prancha 5.....44
 Figuras 33-38. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Tricomas. 33-35. Secções paradérmicas da epiderme na superfície adaxial do folíolo. 36. Secção paradérmica da epiderme na superfície abaxial do folíolo. 37-38. Seções transversais. 33. Aspecto da disposição dos tricomas tectores. 34. Detalhes da base dos tricomas tectores. 35. Disposição das células basais dos tricomas tectores. 36-37. Tricomas tectores multicelulares, evidenciando as paredes entre as células (setas). 38. Tricomas glandulares, com destaque para a cutícula (seta). Coloração: 33-36. Safranina e azul de Astra. 37. Ao natural. 38. Iodoplatinato.

Prancha 6.....45
 Figuras 39-44. Lâmina foliolar de *Senna multijuga*. Secções transversais. 39. Mesofilo com destaque para feixe vascular. 40. Aspecto da nervura central. 41. Detalhe da região abaxial da nervura central do folíolo evidenciando epiderme, colênquima anelar e idioblastos no parênquima e no tecido floemático (asterisco). 42. Margem do folíolo com destaque para as células secretoras no mesofilo (asterisco). 43. Detalhe da margem do folíolo. 44. Nervura em vista longitudinal, evidenciando idioblastos no floema (asterisco). Coloração: azul de Astra e safranina.

Prancha 7.....46
 Figuras 45-50. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Cristais e grãos de amido. 45, 47-50. Seções transversais. 46. Material diafanizado. 45-46. Drusas em células subepidérmicas na região da nervura central do folíolo (setas). 47-48. Cristais prismáticos ao longo da nervura sob luz polarizada. 49. Estômatos com grãos de amido nas células-guarda (setas). 50. Bainha amilífera ao redor da nervura na base do folíolo (seta). Coloração: 45-47. Safranina e azul de Astra. 48. Sem coloração. 49-50. Lugol.

Prancha 8.....47
 Figuras 51-56. Distribuição dos compostos secundários na lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. 51-52. Lâmina foliolar, evidenciando alcalóides em células parenquimáticas do floema (setas). 53-54. Nervura central do mesofilo foliolar, evidenciando alcalóides em células parenquimáticas do floema (setas). 55. Lâmina foliolar, com idioblastos fenólicos nos parênquimas paliçádico e lacunoso (setas). 56. Nervura central do mesofilo foliolar com compostos fenólicos no parênquima do floema (asterisco). Fixadores. 51-54, 56. FNT. 55. SFF. Reagentes. 51-54. Iodoplatinato. 56. Cloreto férrico.

Prancha 9.....48
 Figuras 57-62. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. 57-60. Flavonóides sob fluorescência na epiderme e parênquima (setas e asteriscos). 61. Taninos na camada subepidérmica (asterisco). 62. Nervura central, com destaque para taninos no parênquima do floema (asterisco). 57-58, 60. Material fresco. 59. Fixador FNT. 61-62. Fixador FAA. Reagentes. 57-59. Reagente Natural A. 60. Cloreto de alumínio. 61. Vanilina clorídrica. 62. Acetato de chumbo.

Prancha 10.....49
 Figuras 63-69. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Polissacarídeos, lipídios e terpenos. 63-64. Polissacarídeos (asteriscos). 65-66 Lipídios (seta e asteriscos). 67-69.

Terpenos (setas e asteriscos). Reagentes. 63-64. PAS/Schiff. 65-66. Azul do Nilo. 67-69. Liebermann-Burchard.

Prancha 11.....50

Figuras 70-75. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Aspectos estruturais. 70. Visão geral da ráquis. 71. Visão geral do pecíolo. 72. Grãos de amido no parênquima medular da ráquis (seta). 73. Distribuição dos feixes vasculares no pecíolo. 74. Cristais prismáticos (setas) e idioblastos fenólicos (asterisco) na ráquis. 75. Epiderme papilosa e idioblastos com conteúdos diversos no parênquima cortical do pecíolo. Fixadores. 70-73, 75. FAA. 74. SFF. Coloração. 70, 73, 75. Safranina e azul de Astra. 71-72. Lugol. 74. Ao natural.

Prancha 12.....51

Figuras 76-81. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Alcalóides, compostos fenólicos gerais, cumarinas e flavonóides. 76-77, 80. Ráquis. 78-79, 81. Pecíolo. 76-77. Alcalóides (setas). 78. Compostos fenólicos gerais (setas). 79. Cumarinas (seta). 80-81. Flavonóides (setas). Fixadores. 76-77. FNT. 78. SFF. 79-81. Material fresco. Reagentes. 76-77. Iodoplatinato. 80-81. Reagente Natural A.

Prancha 13.....52

Figuras 82-90. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Polissacarídeos, taninos, lipídios e terpenos. 82, 84-87. Ráquis. 83, 88-90. Pecíolo. 82-83. Polissacarídeos (asteriscos). 84-86. Taninos (setas e asteriscos). 87-88. Lipídios (seta e asteriscos). 89-90. Terpenos (setas e asterisco). Reagentes. 82-83. PAS/Schiff. 84. Acetato de chumbo. 85-86. Vanilina clorídrica. 87-88. Azul do Nilo. 89-90. Liebermann-Burchard.

Prancha 14.....53

Figuras 91-96. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. 91. Aspecto da estrutura a olho nu. 92. Aspecto da porção média da estrutura em secção transversal. 93. Detalhe da epiderme. 94. Parênquima cortical (pc) e parênquima medular (pm) da estrutura secretora. 95. Grãos de amido no parênquima medular (seta). 96. Drusas no parênquima cortical (seta). Coloração: 91. Ao natural. 92. Vanilina clorídrica. 93, 96. Azul do Nilo. 94. Cloreto férrico. 95. Lugol.

Prancha 15.....54

Figuras 97-102. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. Alcalóides, compostos fenólicos e lipídios. 97-98. Alcalóides (setas). 99-100. Compostos fenólicos (asteriscos). 101-102. Lipídios (asteriscos). Reagentes: 97-98. Iodoplatinato. 99-100. Cloreto férrico III. 101-102. Azul do Nilo.

Prancha 16.....55

Figuras 103-108. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. Nectário extrafloral de *Senna multijuga*. Polissacarídeos, taninos e terpenos. 103-104. Polissacarídeos (asteriscos). 105-106. Taninos (setas). 107-108. Terpenos (setas e asteriscos). Reagentes: 103-104. PAS/Schiff. 105-106. Vanilina clorídrica. 107-108. Liebermann-Burchard.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade do mundo, contando com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas, distribuídas principalmente nas florestas tropicais (Guerra & Nodari 2007, Laurance 2009, Metzger 2009). A Mata Atlântica possui características climáticas e edáficas próprias, cujas peculiaridades propiciam a ocorrência de elevada diversidade de espécies. Entretanto, as intensas atividades antropogênicas estão transformando drasticamente esse bioma (Mantovani *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2009), cuja biodiversidade vem sendo ameaçada sem nem mesmo ter sido completamente conhecida (Laurance 2009).

Dentre os biomas brasileiros, o da Mata Atlântica (Coutinho 2009) detém uma parcela significativa de plantas de interesse medicinal e como fornecedoras de insumos para a indústria farmacêutica (Reis *et al.* 2007). Por isso, ressalta-se a urgência na preservação desse bioma e no estudo sistemático de seus remanescentes florestais sob o ponto de vista químico, pois nele poderão ser identificadas fontes alternativas para substâncias já conhecidas e, quem sabe, novos compostos cujas propriedades merecerão estudo aprofundado (Reis *et al.* 2007, Guerra & Nodari 2007).

Diante do fato de que existem milhares de espécies e que estas, em sua grande maioria, não foram avaliadas quanto aos componentes químicos, uma das estratégias é efetuar análise fitoquímica preliminar, por meio da qual são identificados os grupos de metabólitos secundários presentes na planta (Oliveira & Figueiredo 2007). Para algumas substâncias, podem-se realizar reações de caracterização sobre os tecidos vegetais, mas na maioria das vezes, a investigação fitoquímica requer a extração das substâncias com solventes adequados, viabilizando sua caracterização no extrato, através de reações cromáticas ou de precipitação (Falkenberg *et al.* 2007).

Outra abordagem pode ser via realização de bioensaios (Marston *et al.* 2002, Viegas Junior *et al.* 2004a, Gazoni 2009), adequada à detecção de compostos específicos, como no caso de inibidores da enzima acetilcolinesterase que, segundo Antai-Otong (2003) e Kunz (2002), constituem-se nos fármacos de eleição para o tratamento da doença de Alzheimer. A realização de *screening* em extratos ou substâncias isoladas de plantas (Marston *et al.* 2002, Viegas Junior *et al.* 2004a, Gazoni 2009) oferece bons resultados. Dessa forma, promove-se uma bioautografia em camada delgada comparativa (CCDC), que rapidamente proporciona informações sobre a

atividade das substâncias encontradas na planta. Com esse método é possível, também, estabelecer o limite de detecção e compará-lo com padrões pré-estabelecidos (Marston *et al.* 2002, Viegas Junior *et al.* 2004a).

Serrano *et al.* (2009) empregaram o método da cromatografia em camada delgada comparativa para *Senna multijuga* (Rich.) H.S Irwin & Barneby (Leguminosae – Caesalpinioideae), buscando conhecer a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando como padrões a galantamina e a eserina. Verificaram um potencial comparável com a eserina, mas inferior ao apresentado pela galantamina. Além dessa atividade, Serrano (2006) observou moderada ação contra certos fungos fitopatógenos, produzida pelo flavonóide quercitina.

Usualmente são empregadas técnicas histoquímicas quando se deseja conhecer a localização de determinada substância, ou grupo de substâncias químicas, no interior dos tecidos vegetais, ou verificar em qual etapa do desenvolvimento de determinados órgãos elas estão presentes (Corrêa *et al.* 2002, Albuquerque & Neves 2004, Bouzon 2006). Alguns reagentes, quando em contato com certas substâncias, produzem coloração ou precipitados importantes para a identificação de compostos presentes na espécie vegetal que as contém (Jensen 1962, Pearse 1980, Farias 2007).

Por meio dos métodos histoquímicos é possível localizar diferentes substâncias nas secções de tecidos com base em reações químicas específicas, ou em interações macromoleculares de alta afinidade (Jensen 1962, Pearse 1980). As reações histoquímicas também são promovidas com o objetivo de caracterizar certos constituintes químicos auxiliares na identificação das estruturas microscópicas de plantas com interesse medicinal (Farias 2007).

O conhecimento relacionado à estrutura anatômica das plantas pode fornecer informações úteis em várias áreas, desde sua identificação, produção vegetal, propagação vegetativa, qualidade de forrageiras, nutrição vegetal, resistência a organismos patogênicos e ao estresse hídrico e digestibilidade (Silva *et al.* 2005).

Nesse contexto e uma vez que os produtos naturais não se apresentam com uma composição definida e padronizada (Lapa *et al.* 2007), considerou-se pertinente promover uma abordagem de pesquisa multidisciplinar em *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Além da caracterização fitoquímica da espécie, realizaram-se análises estrutural e histoquímica das folhas, a fim de detectar os prováveis sítios de armazenamento de substâncias com potencial bioatividade e contribuir com a geração

de conhecimentos sobre essa espécie, em busca de substâncias que podem vir a se constituir em fonte de fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

1.1. A família Leguminosae Juss. (subfamília Caesalpinioideae DC.)

A família Leguminosae parece ter se originado no Cretáceo e se estabelecido em definitivo no Eoceno (Polhill *et al.* 1981). Este táxon hoje está distribuído por todo o planeta, com exceção dos pólos, ocorrendo preferencialmente nas regiões tropicais (Polhill *et al.* 1981, Forero 2005).

A importância dessa família reside em dois aspectos fundamentais: um de conotação científica – é a terceira maior família botânica, menor apenas que Asteraceae e Orchidaceae (Forero 2005); e outro de conotação econômica (Lewis *et al.* 2005) - historicamente, representantes de Leguminosae têm sido amplamente empregados como fonte de recursos para os mais diversos fins: corantes - pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) (Rizzini & Mors 1995), construção civil – angico (*Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg.), produção de móveis – angico-rajado (*Pithecolobium incuriale* (Vell.) Benth.), paisagismo urbano – cássia (*Senna spectabilis* (DC.) Irwin *et* Barn.) (Lorenzi 1998, Souza & Lorenzi 2008), alimentação – soja (*Glycine max* (L.)) e feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.), Merr.) (Lima *et al.* 2006) e também para fins medicinais – angelim (*Andira anthelmintica* Benth.), dorme-dorme (*Mimosa pudica* L.) e mata pasto (*Senna occidentalis* (L.) Link (Guarim Neto & Morais 2003).

Essa família foi descrita inicialmente por Jussieu (Forero 2005), constituindo-se em objeto de estudos para Bentham & Hooker (1862), Hutchinson (1964), Schulze-Menz (1964), Taktajan (1969), Cronquist (1981), Barneby (1991) e Lewis *et al.* (2005), entre outros. Cada qual a sua maneira procurou caracterizar e explicar Leguminosae, utilizando inicialmente caracteres artificiais, depois naturais e, por fim, modernos métodos filogenéticos.

O enfoque filogenético tem se firmado como método de eleição para conhecer a posição dos táxons estudados, segundo sua história evolutiva (Judd *et al.* 2009). Uma análise filogenética utiliza o máximo possível de informações sobre os organismos que estão sendo estudados, inclusive aspectos bioquímicos e genéticos (Souza & Lorenzi 2008). Estes métodos estão reunidos no que se denominou de ‘sistema APG’ (Angiosperm Phylogeny Group), cuja primeira versão (APG I) foi

lançada em 1998 e a segunda, em 2003 (APG II) (Simpson 2006, Souza & Lorenzi 2008, Judd *et al.* 2009).

As leguminosas também são conhecidas como Fabaceae desde 1836 (APG III 2009), abrangendo três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Simpson 2006, Souza & Lorenzi 2008, Judd *et al.* 2009).

Entretanto, Lewis *et al.* (2005) enfatizam para essa família o uso do termo Leguminosae, que é aceito pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica, uma vez que o termo Fabaceae pode ser confundido com Faboideae (em nível de subfamília) e, também, por se referir a Papilionaceae (em nível de família botânica). Segundo os autores, Leguminosae se enquadra na ordem Fabales, comporta as três subfamílias anteriormente mencionadas e apresenta mais de 730 gêneros e 19.000 espécies.

A principal característica dessa família é o fruto do tipo legume, originado de um ovário unicarpelar e súpero, com um único lóculo, onde se alojam de dois a vários óvulos, por meio de placentação parietal; o legume, ou vagem, abre-se por meio de duas valvas para expulsar as sementes (Lewis *et al.* 2005). Apresenta alto metabolismo de nitrogênio e aminoácidos incomuns, frequentemente com nódulos radiculares contendo bactérias fixadoras desse elemento (Simpson 2006, Judd *et al.* 2009).

Como estratégia de defesa, as Leguminosae lançam mão de associações com formigas (Polhill *et al.* 1981). Estruturas foliares, como as domácias, são citadas por McKey (1989) e Chamberlain & Holland (2009), relacionando-as à presença desses insetos.

Paiva e Machado (2006) mencionam associações entre formigas e nectários extraflorais, como estratégia contra a herbivoria. Em *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Leguminosae), os autores observaram a presença de nectários extraflorais em forma de discos imersos no mesófilo foliolar, sem estômatos e cuja cutícula se rompe com facilidade na fase secretora.

Outra estratégia bem sucedida, em casos de interações com insetos generalistas, é a produção de compostos secundários: taninos, terpenos, alcalóides, aminoácidos não-protéicos, isoflavonóides e fitoalexinas (Polhill *et al.* 1981). Idioblastos fenólicos são de ocorrência generalizada em Leguminosae (Fahn 1988), assim como aqueles contendo cumarinas (Kuster & Rocha 2007).

Em Leguminosae, tem-se observado que alcalóides são produzidos nas folhas e distribuídos aos demais órgãos da planta (Waller & Nowacki 1978, Pozuelo *et al.* 2001, Henriques *et al.* 2007).

A subfamília Caesalpinioideae é considerada um grupo parafilético, ou seja, abriga também gêneros mais proximamente relacionados à Mimosoideae e Faboideae (Simpson 2006, Souza & Lorenzi 2008, Judd *et al.* 2009). Apresenta 150 gêneros e cerca de 2.700 espécies distribuída em todo o mundo (Forero 2005).

Algumas características estruturais e histoquímicas dessa subfamília consistem na presença de cristais isolados ou em grupos (com destaque para a tribo Cassieae), especialmente no mesofilo foliolar, ausência do aminoácido canavanina e presença de flavonóides, especialmente miricetina, quercitina e kaempferol (Dickison 1981), assim como taninos (Metcalf & Chalk 1950).

A presença de cristais de oxalato de cálcio próximo aos feixes vasculares pode estar relacionada à defesa das plantas, conferindo-lhes impalatabilidade frente a insetos fitófagos (Santos *et al.* 2008).

Além dessas características, Watson (1981) menciona a ocorrência de delicados septos em tricomas tectores e de estômatos preferencialmente confinados à superfície abaxial dos folíolos. Metcalf & Chalk (1950) afirmam que o arranjo estomático é variável, mesmo em uma única espécie e, também, que há diversos tipos de tricomas glandulares em Caesalpinioideae. Para os autores, os cristais organizados em grupos constituem uma característica diferencial entre essa subfamília de Leguminosae e as demais.

1.2. O Gênero *Senna* Mill.

Reunindo 250 espécies (Judd *et al.* 2009), o gênero *Senna*, juntamente com *Cassia* e *Chamaecrista*, está alocado em Cassieae, uma das quatro tribos de Caesalpinioideae (Lewis *et al.* 2005). Sua distribuição é pantropical, ocorrendo preferencialmente nas Américas, África e Austrália (Carvalho 2004).

Várias espécies de *Cassia* passaram a ser designadas como *Senna* (Carvalho 2004). Segundo o autor, a diferença entre os gêneros baseia-se no porte, na presença ou não de bractéolas e de nectários e nas características do androceu e do fruto. A presença

de nectários extraflorais em ráquis de espécies do gênero *Senna* é corroborada por McKey (1989).

Segundo Metcalfe & Chalk (1950), as folhas de *Senna* podem ser identificadas por meio dos tricomas unicelulares com paredes espessas, células epidérmicas eventualmente divididas no sentido periclinal, estômatos paracíticos em ambas as superfícies, mesofilo isobilateral com uma única camada de parênquima paliádico em ambas as superfícies, parênquima lacunoso no centro do mesofilo, contendo cristais de oxalato de cálcio agrupados, feixes vasculares circundados por fibras e, externamente a estas, células contendo cristais solitários.

Metcalfe & Chalk (1950) mencionam a ocorrência de estômatos em ambas as superfícies foliulares de *Senna angustifolia* (Vahl) Batka.

Em *Senna alata* (L.) Roxb., Rodrigues *et al.* (2009a) verificaram lâmina foliolar anfiestomática, mesofilo dorsiventral e epiderme abaxial papilosa, predomínio de estômatos paracíticos, ocorrendo também anisocíticos, tricomas glandulares e tectores, estes unisseriados.

A presença de antraquinonas no gênero *Senna* constitui um caráter quimiotaxonômico (Falkenberg 2007, Rodrigues *et al.* 2009b). Espécies de *Senna* são comumente empregadas devido à ação laxativa das antraquinonas (Barba *et al.* 1992, Viegas Junior *et al.* 2006, Falkenberg 2007, Lombardo *et al.* 2009). Em *S. multijuga*, as antraquinonas foram encontradas nas sementes (Singh 1981).

Uma vez que esse táxon inclui espécies produtoras de metabólitos secundários de interesse, investigações têm sido realizadas: Viegas *et al.* (2004b), por meio de análises fitoquímicas, verificaram a presença de alcalóides em *Senna spectabilis* (DC) H.S. Irwin & Barneby, entre eles a espectralina, um alcalóide piperidínico com preliminar ação anticolinesterásica; e Serrano *et al.* (2009), isolaram dois alcalóides piridínicos com essa mesma atividade e um flavonóide (quercitina) em *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.

1.3. A espécie *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby

Senna multijuga é também conhecida pelas sinônimas *Cassia multijuga* Rich, *Cassia verrucosa* Vogel, *Cassia ampliflora* Steud, *Cassia calliantha* G. Mey.,

Cassia doylei (Britton & Rose) Lundell, *Cassia fulgens* Wall., *Cassia marimari* Aubl., *Cassia richardiana* Kunth, *Chamaesenna multijuga* (Rich.) Pittier, *Peirania aristulata* Britton & Killip e *Peirania multijuga* (Rich.) Britton & P. Wilson (Carvalho 2004, Tropicos 2010).

Apresenta as seguintes subespécies e variedades: *Senna multijuga* subsp. *multijuga* var. *multijuga*, *Senna multijuga* subsp. *multijuga* var. *verrucosa* (Vog.) Irwin & Barneby, *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) Irwin & Barneby var. *lindleyana* (Carvalho 2004), *Senna multijuga* subsp. *multijuga* var. *peregrinatrix* H. S. Irwin & Barneby e *Senna multijuga* subsp. *doylei* (Britton & Rose) H. S. Irwin & Barneby (Tropicos 2010).

De acordo com Lorenzi (1998), a espécie é conhecida popularmente como pau-cigarra, caquera ou aleluia, ocorrendo em quase todo o Brasil, em áreas de domínio da Mata Atlântica; é uma planta de porte médio, decídua no inverno, heliófila, indiferente às condições físicas do solo e característica de vegetação secundária em estágio inicial de sucessão (Figura 1).

Esta espécie tem sido citada em diversos levantamentos florísticos corroborando sua ampla distribuição: Bahia (Carvalho Sobrinho & Queiroz 2005), Minas Gerais (Rodrigues *et al.* 2003, Meyer *et al.* 2004), São Paulo (Cielo Filho & Santin 2002, Kotchetkoff-Henriques *et al.* 2005), Paraná (Veiga *et al.* 2003) e Rio Grande do Sul (Rodrigues *et al.* 2005).

Por ocorrer em áreas de borda e locais alterados (Souza & Lorenzi 2008), e devido à sua rusticidade, *S. multijuga* costuma ser empregada em projetos de recuperação de áreas degradadas e, por esta razão, foram conduzidos estudos visando conhecer sua taxa de germinação sob semeadura direta (Santos Junior *et al.* 2004), o vigor das sementes (Ferreira *et al.* 2004), bem como o desenvolvimento de mudas em ambiente de mata ciliar (Pereira *et al.* 1999), seu papel no processo de sucessão secundária (Oliveira 2002) e fenologia (Oberlander 2006).

Custódio Filho & Mantovani (1986), estudando exemplares de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) Irwin & Barneby no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga na cidade de São Paulo (SP), descreveram suas folhas, ressaltando o pecíolo canaliculado, a presença de uma glândula estipitada raqueal na primeira juga, 11-16 jugas, estípulas caducas, folíolos opostos, oblongo-lanceolados, pubescentes quando jovens, com ápice retuso e mucronado.

Estruturalmente, foram descritos o embrião (Oliveira 1999), o carpelo (De-Paula & Oliveira 2007) e os cotilédones e eófilos (Moreira-Coneglian & Oliveira 2006) de *S. multijuga*.

Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) observaram que a epiderme se apresenta sinuosa em ambas as faces dos cotilédones e eófilos, os cotilédones são anfiestomáticos e os eófilos hipostomáticos, ambos apresentando arranjo estomático anomocítico; células-guarda se localizam em nível mais baixo que as células subsidiárias; tricomas estão ausentes nos cotilédones e eófilos; o mesofilo é dorsiventral; idioblastos fenólicos ocorrem no mesofilo eofilar e as cavidades secretoras estão ausentes; uma bainha contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio contorna os feixes vasculares dos cotilédones e do mesofilo eofilar.

Em plântulas de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, Amorin *et al.* (2008) verificaram pecíolo com superfície adaxial acanalada e abaxial arredondada na base, mas carenada na porção terminal e, na superfície adaxial da ráquis, entre cada par de folíolos, a projeção de uma glândula crassa, alongada, de coloração amarelada e de formato cônico, que classificaram como estipuliforme.

Estudos relacionados à bioprospecção para fins medicinais de espécies da flora brasileira igualmente mencionam *S. multijuga* (Serrano 2006, Viegas Junior *et al.* 2006, Serrano *et al.* 2009). Entretanto, informações relativas à sua estrutura anatômica ainda são escassas, restringindo-se aos trabalhos acima mencionados.

1.4. Pesquisa de novos fármacos

Plantas são utilizadas tradicionalmente pelas populações de todos os continentes como matéria prima para a síntese de substâncias bioativas (Barreiro *et al.* 2007). Inúmeras pesquisas têm sido conduzidas procurando conhecer os compostos secundários da flora brasileira (Pinto *et al.* 2002) e sua atividade biológica sobre outros organismos (Lapa *et al.* 2007, Phillipson 2007).

Substâncias biologicamente ativas extraídas de plantas, que se constituem em modelos para a síntese de fármacos, distinguem-se das sintéticas por apresentarem uma grande diversidade molecular (Guerra & Nodari 2007). O empenho em investigar plantas se deve ao fato de que produzem compostos secundários, substâncias químicas provenientes de rotas metabólicas diversificadas, a partir dos produtos da glicólise

(Santos 2007), os quais constituem os compostos ativos de diversos medicamentos (Schenkel *et al.* 2007a).

Houve um período em que se considerou esgotada a existência de moléculas vegetais utilizáveis como protótipos para a síntese de medicamentos, quando se supôs que todos os compostos ativos já houvessem sido isolados e pesquisados. Atualmente, porém, buscam-se novas propriedades para essas substâncias, como é o caso da galantamina, empregada no tratamento da doença de Alzheimer (Barbosa Filho *et al.* 2006, Schenkel *et al.* 2007a).

A análise fitoquímica preliminar é utilizada para identificar os grupos de compostos secundários, quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, ou pode ser relevante para direcionar a investigação para o isolamento e a elucidação estrutural dessas substâncias (Falkenberg *et al.* 2007, Oliveira & Figueiredo 2007).

A pesquisa fitoquímica é igualmente empregada para direcionar a busca por substâncias com atividade biológica, terapêutica ou tóxica, sobre outros seres. Usando essa técnica, Viegas Junior *et al.* (2006) relacionaram as propriedades farmacológicas do gênero *Cassia* L., Marinho (2008) associou a fitoquímica de *Byrsonima sericea* DC. à sua aplicabilidade dermatológica e Gazoni (2009) avaliou o efeito anticolinesterásico do extrato e compostos isolados de *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez.

Dentre os testes habitualmente executados na atualidade, estão os bioensaios simplificados, que apontam a seleção de extratos, frações e substâncias a serem isoladas (Schenkel *et al.* 2007a). A combinação de bioensaios com técnicas cromatográficas, unindo métodos de separação e detecção de atividade biológica (bioautografia), tem sido igualmente empregada com sucesso (Schenkel *et al.* 2007a). Esse procedimento foi utilizado por Serrano (2006) para testar as atividades antifúngica e anticolinesterásica de frações do extrato de *Senna multijuga*. Bustamam *et al.* (2008) empregaram o mesmo método para testar a atividade anticolinesterásica de *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm., obtendo resultados promissores.

Uma vez que esses testes iniciais apontem resultados de interesse, são realizados ensaios de bioatividade e toxicidade *in vitro* (Ikuno *et al.* 2003) e com animais de laboratório (ensaios pré-clínicos) a partir da substância isolada (Braggio *et al.* 2002, Mariot & Barbieri 2007) para, somente então, serem efetuados ensaios em humanos (clínicos) (Lapa *et al.* 2007).

Sobre os animais, incluindo o homem, sabe-se até o momento que compostos fenólicos atuam como antioxidantes, antiinflamatórios e anticoagulantes; taninos têm ação antidiarréica e protetora dos tecidos; flavonóides são antihipertensivos, anticoagulantes e protegem os vasos sanguíneos; terpenos têm ação antioxidante e protegem o organismo contra a ação de radicais livres; e os alcalóides se constituem em agentes antitumorais, antiinfeciosos, anestésicos locais e atuam, também, sobre os sistemas nervosos central e autônomo (Bruneton 1995).

1.5. Compostos secundários em plantas

Além de estruturas mecânicas, plantas dispõem de recursos químicos para interagirem com o ambiente, ou seja, os compostos do metabolismo secundário. Essas substâncias têm sido exaustivamente estudadas buscando conhecer seu papel para as plantas (Lambers *et al.* 1998, Harborne 2001) e, também, no tratamento das mais diversas patologias que afetam a espécie humana (Barbosa *et al.* 2006, Barreiro *et al.* 2007, Phillipson 2007).

Quando as reais funções dos compostos secundários para as plantas não eram conhecidas, afirmava-se que seriam produtos de excreção (Santos 2007). Tal conceito tem sido reavaliado (Henriques *et al.* 2007), uma vez que vários trabalhos vêm sendo publicados apontando suas funções específicas para as plantas, tais como deterrentes para animais herbívoros, proteção contra injúrias mecânicas, atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra microorganismos, em eventos alelopáticos, proteção contra raios ultravioleta, dentre outras (Levin 1973, Fahn 1974, Duffey 1986, Fahn 1988, Lambers *et al.* 1998, Silva *et al.* 2004, Silva *et al.* 2006, Häkkinen *et al.* 2007, Maffei *et al.* 2007). Acredita-se que a produção desses compostos por determinadas espécies pode ser o resultado de sua adaptação às condições ambientais, garantindo a sobrevivência dos indivíduos e a perpetuação da espécie (Macías *et al.* 2007).

A composição química das plantas não é homogênea, sendo quatro os fatores relacionados às alterações no tipo e quantidade de compostos secundários: genótipo (Werker *et al.* 1994, Mariot & Barbieri 2007), fase do ciclo vegetativo (Werker & Fahn 1981, Fico *et al.* 2000), fatores ambientais (Bussoti *et al.* 1998, Gobbo-Neto & Lopes

2007, Mariot & Barbieri 2007) e práticas agrícolas de cultivo e de colheita (Saroya 2006).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de substâncias produzidas durante o metabolismo primário (Macías *et al.* 2007), tendo geralmente distribuição restrita a determinado gênero ou espécie (Larsson 2007).

A linha divisória entre metabolismo primário e secundário não é nítida, mas sabe-se que os compostos secundários derivam do metabolismo da glicose, a partir de dois compostos intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Santos 2007). Tais rotas metabólicas têm sido bem documentadas por Harborne (1968), Bruneton (1995) e Taiz & Zeiger (2004).

Além das rotas do ácido chiquímico e do acetato, identificou-se uma terceira via metabólica envolvida na produção dos compostos secundários. Por meio da rota do metil-eritritol-fosfato (MEP), que ocorre em plastídios, são produzidos isoprenóides, dentre outros compostos de importância biológica e biotecnológica (Yamazaki *et al.* 2004, Murata *et al.* 2008, Córdoba *et al.* 2009).

Os compostos secundários têm sido alvo de inúmeras investigações, buscando conhecer sua origem, funções e, especialmente, as maneiras como podem ser empregados pelo homem (Waller & Nowacki 1978, Werker *et al.* 1994, Bruneton 1995, Harborne 1995, Saroya 2006, Gobbo-Neto & Lopes 2007). Uma vez que diversos povos ao longo da evolução humana na Terra têm utilizado plantas com propósitos medicinais, vários estudos foram conduzidos e correlacionaram sua atividade farmacológica aos compostos secundários que produzem (Barbosa Filho *et al.* 2006, Barreiro *et al.* 2007, Corrêa *et al.* 2008, Areche *et al.* 2009).

Essas substâncias podem ser classificadas quimicamente através de grupos funcionais (Zenk & Juenger 2007) ou do esqueleto básico, determinando-se grupos e subgrupos. Podem ser igualmente classificadas de acordo com sua origem biossintética, ou seja, a rota bioquímica de sua síntese (Ziegler & Facchini 2008). Considerando sua natureza química, os compostos secundários costumam ser agrupados em três distintas categorias: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz & Zeiger 2004).

Além de conhecer os ciclos biossintéticos dos compostos secundários, tem-se procurado caracterizar seus locais de síntese e acumulação no meio intracelular, bem como seu papel específico para as plantas.

1.5.1. Terpenos

Os terpenos são formados pela união de unidades isoprênicas pentacarbonadas e se caracterizam por ser geralmente insolúveis em água e sintetizados a partir da acetil coenzima A (acetil CoA) ou de intermediários glicolíticos (via mevalonato) (Taiz & Zeiger 2004, Santos 2007). Dentre os compostos terpênicos destacam-se os óleos essenciais, as oleoresinas, as piretrinas, os heterosídeos cardioativos, as saponinas e os carotenóides (Werker *et al.* 1994, Bruneton 1995, Taiz & Zeiger 2004, Rates & Bridi 2007).

De acordo com Werker & Fahn (1981) e Yazaki (2006), os retículos endoplasmáticos liso (REL) e rugoso (RER), bem como o complexo de Golgi, com a participação de mitocôndrias e plastídios, estão envolvidos na síntese de terpenos. Esses costumam se acumular nos vacúolos e no citoplasma das células e nas cavidades subcuticulares de tricomas glandulares de folhas. São encontrados, também, em flores e em ductos resiníferos de plantas lenhosas (Luckner *et al.* 1980, Yazaki 2006).

Nas plantas em que ocorrem, os terpenos estão relacionados à defesa contra microorganismos, fungos, insetos e nematóides (Asakawa 1999, Viegas Junior 2003).

Heterosídeos cardioativos são moléculas complexas formadas por um anel lactônico, um núcleo esteroidal e resíduos de açúcar; no homem apresentam ação sobre o músculo cardíaco, podendo ter atividade terapêutica ou tóxica (Rates & Bridi 2007).

Carotenóides estão amplamente distribuídos na natureza, acumulando-se em cloroplastos de todos os tecidos fotossintetizantes e atuando na proteção contra radiações perigosas (Bruneton 1995).

Saponinas atuam, no ser humano, sobre a permeabilidade das membranas celulares, têm ação hipocolesterolemizante e antiviral (Schenkel *et al.* 2007b), além de agir sobre a filtração glomerular, provocando efeito diurético (Ruiz *et al.* 2003).

1.5.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados por um grupo fenol (uma hidroxila funcional ligada a um anel aromático) e, por se constituírem em um grupo quimicamente heterogêneo, alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há os que são grandes

polímeros insolúveis (Taiz & Zeiger 2004, Castro & Demarco 2008). Dentre os compostos fenólicos encontram-se os fenóis simples, as lignanas e ligninas, as cumarinas, os flavonóides e isoflavonóides, as antocianinas, os taninos e as quinonas (Ikan 1991, Vermerris & Nicholson 2006, Haslam 2007, Santos 2007, Castro & Demarco 2008), o que explica sua ampla distribuição.

Compostos fenólicos são citados como substâncias deterrentes, alelopáticas, protetoras contra os raios ultravioleta do sol, entre outras funções (Harborne 2001, Taiz & Zeiger 2004, Castro & Demarco 2008).

Sua produção ocorre no retículo endoplasmático, citoplasma e vacúolo, acumulando-se principalmente nesta organela (Bussoti *et al.* 1998, Castro & Demarco 2008), mas também na membrana plasmática e/ou na parede celular, podendo sofrer exocitose (Luckner *et al.* 1980, Gross 1999, Yazaki 2006). Esses compostos podem ser encontrados em todos os órgãos da planta, inclusive em estruturas secretoras (Ikan 1991, Ciccarelli *et al.* 2001, Haslam 2007, Castro & Demarco 2008).

Taninos estão abundantemente distribuídos entre as plantas, associados à defesa contra herbivoria e patógenos (Parham & Kaustinen 1977, Castro & Demarco 2008), atuando como substâncias deterrentes, uma vez que precipitam proteínas, causando adstringência e dificultando a digestão (Lambers *et al.* 1998, Ciccarelli *et al.* 2001, Harborne 2001, Santos e Mello 2007, Castro & Demarco 2008, Nascimento-Silva *et al.* 2008). Aos taninos são atribuídas propriedades antidiarréicas, antiinflamatórias e antissépticas (Vermerris & Nicholson 2006).

As cumarinas parecem estar relacionadas às deficiências nutricionais de seus produtores, lesão mecânica ou ataque de insetos (Kuster & Rocha 2007).

Flavonóides são encontrados na natureza de forma livre (agliconas ou geninas), ou conjugados com açúcares (heterosídeos), conferindo diferentes pigmentações às plantas, ou sabor amargo e adstringência (Zuanazzi & Montanha 2007).

Esses compostos estão associados à atração de polinizadores e dispersores e à proteção contra os raios UV, podendo ocorrer em tricomas glandulares (Tattini *et al.* 2000) e tectores (Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro 2005, Gould & Lister 2006, Castro & Demarco 2008). Além disso, são também relacionados à proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, controle da ação de hormônios vegetais, em alelopatias e como inibidores de enzimas (Gould & Lister 2006, Zuanazzi & Montanha 2007, Castro & Demarco 2008).

1.5.3. Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados constituem uma grande e heterogênea classe de metabólitos secundários; caracterizando-se pela presença de nitrogênio em sua estrutura molecular, sendo, geralmente, sintetizados a partir de aminoácidos comuns. Desse grupo fazem parte os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não-protéicos (Santos 2007, Zenk & Juenger 2007).

Os alcalóides costumam ser produzidos pelo RER, com a participação de inúmeras proteínas responsáveis por seu transporte até o vacúolo celular (Henriques *et al.* 2007). Podem ser sintetizados em determinadas partes da planta e transportados para outras, dependendo do táxon considerado (Luckner *et al.* 1980, Ikan 1991, Bruneton 1995, Henriques *et al.* 2007, Ziegler & Facchini 2008).

Em Solanaceae, a exemplo de *Nicotiana* L., a síntese da nicotina ocorre nas raízes, sendo transportada para as demais partes da planta pelo xilema (Heldt 1996, Yazaki 2006). A ricinina parece ser sintetizada por todas as partes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), especialmente naquelas de crescimento mais ativo (Waller & Nowacki 1978). Na papoula (*Papaver somniferum* L. Papaveraceae) os alcalóides são sintetizados nas paredes dos vasos do floema e células companheiras, sendo acumulados nos laticíferos (Bird *et al.* 2003).

De acordo com Waller & Nowacki (1978) e Ziegler & Facchini (2008), em Leguminosae os alcalóides são sintetizados nas folhas e distribuídos aos demais órgãos do vegetal. Esta informação foi corroborada por Zamora-Natera *et al.* (2009), os quais afirmam que, em *Lupinus exaltatus* Zucc., os alcalóides são igualmente produzidos nas folhas e distribuídos aos demais órgãos, sendo armazenados nos frutos e sementes.

Dentre as funções apontadas para os alcalóides nas plantas estão a prevenção à herbivoria, devido ao seu sabor amargo ou toxicidade, a detoxificação celular, a reserva de nitrogênio e a ação antimicrobiana (Häkkinen *et al.* 2007, Henriques *et al.* 2007).

1.6. Análises fitoquímica e histoquímica

O interesse pela constituição química das plantas data do início do século XIX, quando eram pesquisadas drogas vegetais com reconhecidas propriedades tóxicas

ou medicinais, fragrâncias e flavorizantes alimentares, que pudessem ser comercializadas ou, de alguma forma, utilizadas pelo homem (Geissman & Crout 1969, Reynolds 2007).

Os estudos sobre produtos naturais foram inicialmente conduzidos por químicos e farmacêuticos, a exemplo de Sertürner, que isolou a morfina em 1806, abrindo caminho para as descobertas posteriores relacionadas aos compostos secundários dos vegetais (Hartmann 2007).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos das plantas ou avaliar sua presença. Estudos em fitoquímica têm sido decisivos também para compreender o papel dos compostos secundários para as plantas em suas interações com outros seres e com o meio (Harborne 2001, Tattini *et al.* 2004, Macías *et al.* 2007), bem como na caracterização do metaboloma da planta e de seus eventos fisiológicos (Ferne 2007), de seu genótipo (Petersen 2007) e em quimiosistemática (Grayer *et al.* 1999, Macías *et al.* 2007, von Poser & Mentz 2007).

O desenvolvimento de estudos em fitoquímica não teria sido possível sem o conhecimento das estruturas químicas dos constituintes das plantas, o que só ocorre quando se utiliza suficiente quantidade de matéria prima e métodos adequados para elucidar suas estruturas (Macías *et al.* 2007).

Por meio de técnicas histoquímicas é possível localizar os compostos secundários no tecido vegetal, de modo a conhecer seu local de síntese e/ou acúmulo (Gahan 1984, Sumner 1988). A histoquímica botânica combina histologia com bioquímica analítica, cujos métodos baseiam-se em técnicas qualitativas (Khasim 2002).

A histoquímica teve início com Raspail, químico francês, na década de 1820 (Gahan 1984). Diferentemente da fitoquímica, a histoquímica consiste na investigação dos componentes químicos de tecidos biológicos, observados *in situ*, com o auxílio de microscópio (Sumner 1988). Para este fim utilizam-se reagentes específicos, uma vez que os constituintes celulares reagem diferentemente, evidenciando uma variedade de colorações e intensidades que permitem distingui-los entre si (Khasim 2002).

Pearse (1961) alerta para o fato de que a histoquímica deve se fundamentar em princípios da química e da bioquímica e que seus avanços somente serão possíveis se continuarem baseados nessas ciências.

A identificação dos constituintes químicos característicos de uma espécie exige conhecimentos fitoquímicos prévios, pois as reações histoquímicas geralmente são inespecíficas e ocorrem através de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias

substâncias, podendo fornecer resultados denominados “falsos positivos” (Pearse 1961, Bruneton 1995, Falkenberg *et al.* 2007, Farias 2007).

Para evitar ou reduzir a possibilidade de tais eventos interferirem nos resultados, realizam-se testes denominados “controles negativos”, que consistem em extrair de algumas amostras a substância que se deseja identificar e testá-las para as referidas substâncias, as quais não devem ser encontradas (Lison 1960, Ramsey & Berlin 1976, Pearse 1980, Furr & Mahlberg 1981). Outro ponto a ser ressaltado é a realização de observações em amostras não submetidas à reação, para conhecer a coloração natural dos tecidos e não confundir com o resultado de alguma reação histoquímica, constituindo o que se denomina “branco” (Figueiredo *et al.* 2007). Os chamados “controles positivos” relacionam-se a amostras de plantas que classicamente apresentam os compostos que se deseja pesquisar, constituindo uma referência para os resultados a serem obtidos (Costa 2000).

Os métodos utilizados em histoquímica baseiam-se na produção de cor quando determinado reagente entra em contato com uma substância química no tecido por meio de ligação química ou dissolução no substrato (Sumner 1988). Reagentes que, segundo a autora, consistem em corantes, seus derivados ou sais metálicos.

Em alguns casos, o substrato está mascarado por outras substâncias, as quais devem ser removidas do tecido; e, para que os procedimentos sejam bem sucedidos, Sumner (1988) também recomenda a realização dos controles negativos. Estes métodos são decisivos para o sucesso dos testes histoquímicos. Para atingir bons resultados, a realização de testes histoquímicos deve obedecer a determinados critérios: simplicidade, visibilidade, sensibilidade, especificidade, localização e reprodutibilidade; além disso, ainda existem constituintes tissulares para os quais não há testes específicos ou realizáveis (Sumner 1988).

De acordo com Gahan (1984), o maior obstáculo para o progresso da histoquímica é a preparação dos tecidos, uma vez que órgãos inteiros não podem ser rapidamente examinados como tais, sendo necessário realizar secções histológicas ou preparados de células individualizadas, pois se sabe que mesmo os melhores processos de preparação histológica não preservam todos os componentes celulares.

Métodos histoquímicos têm sido desenvolvidos para realizar análise qualitativa e quantitativa de virtualmente todos os componentes celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucléicos e a gama de compostos iônicos encontrados no suco celular (Gersbach *et al.* 2001). Dessa forma, Corsi & Biasci (1998)

localizaram alcalóides em *Conium maculatum* L. (Apiaceae), Ascensão *et al.* (2005) elucidaram a composição histoquímica do labelo de *Ophrys fusca* Link e *Ophrys lutea* Cav. (Orchidaceae), Rodrigues (2008) identificou os compostos de *Senna alata* (Leguminosae) com atividade alelopática e Thadeo *et al.* (2009) identificaram o conteúdo secretado por ductos e cavidades de *Casearia decandra* Jacq., sucedânea da planta medicinal *Casearia sylvestris* Sw. (Leguminosae).

Certos autores (Johansen 1940, Lillie, 1948 in Clark, 1973) preferem utilizar materiais fixados em fixadores diversos (formalina neutra tamponada, ou com ácido acético e etanol, ou com sulfato ferroso) e armazenados em etanol para a realização de testes histoquímicos.

Entretanto, técnicas de fixação e/ou armazenamento do material a ser testado, que empreguem etanol, devem ser cuidadosamente ponderadas, uma vez que, segundo Falkenberg *et al.* (2007), praticamente todos os constituintes de interesse apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas, de modo que estas costumam ser empregadas com frequência em processos extrativos.

Devido aos inconvenientes gerados por essas técnicas, Gahan (1984), Hohmann *et al.* (2001), Khasim (2002) e Fernandes (2007) preferem utilizar material fresco, enquanto Valkama *et al.* (2004) sugerem o congelamento das amostras, caso não seja possível realizar as análises imediatamente.

Diversos pesquisadores no século XX propuseram métodos em histoquímica para conhecer a localização de substâncias específicas nos tecidos, como Johansen (1940), Cain (1947), McMannus (1948), Pearse (1961), David & Carde (1964), Gerlach (1969), Ganter & Jollés (1969/1970), Clark (1973), Pizzolato & Lillie (1973), Mace & Howell (1974), Furr & Mahlberg (1981), entre outros. Os métodos desenvolvidos por esses visavam histolocalizar substâncias com características próprias, ou seja, para que os testes produzam resultados confiáveis, devem seguir corretamente a metodologia proposta.

Assim, alcalóides formam sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais, usualmente obtidos na forma de precipitados, que também podem ser formados por proteínas, algumas cumarinas e lignanas, entre outros, de modo que a formação de precipitado pode ser considerada apenas como provável presença de alcalóides (Henriques *et al.* 2007). Esses compostos podem ser extraídos por meio de soluções contendo ácido acético, ou etanol e ácido (Henriques *et al.* 2007). Segundo Yoder & Mahlberg (1976), alguns reagentes fornecem melhores resultados do que

outros. São utilizados comumente os reagentes de Bertrand, Dragendorff, Hager, Mayer e Wagner, havendo alguns menos utilizados como o iodoplatinato (Henriques *et al.* 2007).

Compostos fenólicos constituem uma grande classe de substâncias solúveis em água e em solventes orgânicos polares, sendo quimicamente muito reativos; podem ser obtidos por meio de extração etanólica de material fresco ou desidratado (Carvalho *et al.* 2007). Usualmente emprega-se pesquisa direta de compostos fenólicos totais em lâminas permanentes não coradas, preparadas a partir de material fixado em sulfato ferroso e formalina (Aguilera *et al.* 2004, Fonseca *et al.* 2006, Castro & Demarco 2008).

As cumarinas apresentam fluorescência quando em meio alcalino, ou ácido (Kuster & Rocha 2007). Os flavonóides, devido à sua grande labilidade, não são detectáveis em microscopia de luz (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006), mas podem ser observados através de suas absorbâncias em UV, e por meio de ensaios cromáticos com soluções alcalinas ou ácidas, destacando-se o Reagente Natural A que, sob fluorescência, proporciona coloração laranja, amarela ou verde e é empregada para identificar todos os grupos de flavonóides e o cloreto de alumínio, que também produz fluorescência em flavonóides (Zuanazzi & Montanha 2007, Castro & Demarco 2008). Seguindo metodologias propostas por Schnitzer *et al.* (1996) e Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro (2005), a pesquisa de flavonóides deve ser realizada com amostras frescas.

Em fitoquímica, os taninos geralmente não se prestam a análises em material fresco, recomendando-se sua desidratação. A presença de água em solventes orgânicos pode aumentar significativamente a extração de taninos e outros compostos fenólicos (Santos & Mello 2007), dificultando sua histolocalização. Em histoquímica costumam ser identificados por meio de cloreto férrico e vanilina clorídrica (Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro 2005, Castro & Demarco 2008).

Heterosídeos cardioativos são em geral solúveis em água, mas também no etanol e no clorofórmio; para sua extração devem-se utilizar preferencialmente plantas frescas submetidas a misturas hidroalcoólicas (Rates & Bridi 2007). Uma vez que são compostos por um anel lactônico, um núcleo esteroidal e resíduos de açúcar, realizam-se testes específicos para verificar a presença dessas substâncias: terpenos (reações de Liebermann-Burchard e de Salkowsky), e lactonas (reações de Kedde, Keller-Kiliani e Xantridol) (Costa 2000, Falkenberg *et al.* 2007, Rates & Bridi 2007).

Lipídios são grandes moléculas de origem biológica, solúveis em solventes orgânicos, dentre os quais se destacam os óleos fixos, não voláteis, que consistem em misturas de substâncias lipídicas encontradas com mais frequência nas sementes (Moyna & Heinzen 2007, Simões & Spitzer 2007). Óleos voláteis ou essenciais compreendem substâncias odoríferas com solubilidade limitada em água, mas solúveis em solventes orgânicos apolares, cuja constituição é bastante diversificada: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, fenóis, cumarinas, entre outros (Simões & Spitzer 2007). Em histoquímica, lipídios ácidos e neutros são pesquisados por meio de Sulfato Azul do Nilo (Ganter & Jollès 1969, 1970).

Atualmente, pesquisas multidisciplinares são recomendadas (Castro & Demarco 2008), envolvendo fito e histoquímica, a exemplo dos trabalhos de Dutra (2008), Fiuza *et al.* (2008) e Marinho (2008), otimizando a obtenção dos resultados.

Inúmeros estudos, com abordagens diversas, têm feito uso dessas técnicas, como os de Aguilera *et al.* (2004), que histolocalizaram alcalóides e compostos fenólicos em *Siegesbeckia orientalis* L. (Asteraceae), Paiva & Machado (2006) que determinaram a natureza química do material secretado pelos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne (Leguminosae), e Nascimento-Silva *et al.* (2008) que localizaram taninos e outros compostos fenólicos em *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), espécie utilizada na medicina tradicional no Nordeste do Brasil, e Santos *et al.* (2009) que histolocalizaram os alcalóides em folhas e raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae).

1.7. Análise estrutural

Análises estruturais detêm métodos imprescindíveis para a adequada caracterização dos órgãos da planta que apresentam/produzem substâncias com propriedades medicinais, razão pela qual se constituem no foco deste trabalho. A descrição anatômica como instrumento para a correta identificação botânica apresenta intensa relevância no controle de qualidade da matéria-prima vegetal usada na produção de medicamentos (Samuelsson 1999, Evans 2002, Farias 2007).

Embora a metodologia de preparação do material para análises estruturais esteja bem estabelecida (Brito & Alquini 1996, Kraus & Arduin 1997), Feder & O'Brien (1968) mencionam que eventualmente os processos de fixação em FAA e

emblocamento em parafina geram dificuldades técnicas que podem alterar aspectos estruturais melhor observados em secções de material fresco.

Em estudos farmacobotânicos são importantes a forma da célula, seu conteúdo, a natureza e o espessamento de sua parede, os tipos de tecido presentes no órgão vegetal e suas características (Costa, 2000), entre outros aspectos como a presença de domácias (Silva *et al.* 2009) e o padrão de venação (Cardoso & Sajo 2004, Reis *et al.* (2004). Esta característica foliar foi bem documentada por Hickey (1973) e Cardoso & Sajo (2006). De acordo com Roth-Nebelsick *et al.* (2001), as nervuras têm como principais funções o transporte da seiva por meio de tecidos condutores e a estabilização mecânica devido à presença de elementos esclerificados.

Cristais constituem igualmente um bom caráter diagnóstico e, na planta, estão normalmente associados à defesa contra herbivoria, uma vez que lhe conferem impalatabilidade frente a insetos fitófagos (Santos *et al.* 2008). Além disso, relacionam-se ao balanço iônico, imobilização do oxalato e suporte estrutural (Franceschi & Nakata 2005, Navarro *et al.* 2007).

Para Metcalfe (1979), os cristais são secretados nas cavidades celulares, sendo facilmente visíveis; as células cristalíferas, também denominadas idioblastos cristalíferos, podem ser morfológicamente semelhantes às células no seu entorno, das quais se distinguem unicamente devido ao conteúdo.

O aspecto da epiderme foliar não é uniforme, sendo constituída por diversos tipos de tricomas, estômatos e células especializadas (Fahn 1974). As células da epiderme podem variar no formato, tamanho e orientação em diferentes partes de uma única folha (Metcalfe 1979). Segundo Taiz & Zeiger (2004), a epiderme com células convexas pode ser observada em plantas de ambientes sombreados, pois atua como lentes, concentrando a luz solar.

Tricomas podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de conteúdo, número e aspecto de suas células, ornamentações, espessura da parede, entre outros caracteres (Theobald *et al.* 1979, Behnke 1984). Aos tricomas tectores são atribuídas funções essenciais para a sobrevivência das plantas, tais como a redução da perda de água por transpiração, redução da temperatura da superfície foliar e redução da herbivoria (Beal 1878, Levin 1973, Werker & Fahn 1981, Duffey 1986, Wagner *et al.* 2004). Essa última função é atribuída pelos mesmos autores também aos tricomas glandulares, os quais foram bem documentados por Fahn (1988).

Os estômatos estão relacionados às trocas gasosas e regulação hídrica da planta, sendo classificados de acordo com a forma e o arranjo das células subsidiárias (Wilkinson 1979). As células-guarda podem tomar forma arredondada, triangular ou papilosa (Wilkinson 1979). Alquini *et al.* (2003) associam ao ambiente a posição das células estomáticas em relação à superfície foliar e, para Menezes *et al.* (2003), a presença de estômatos em ambas as superfícies foliares pode estar associada a ambientes xéricos.

Domácias estão envolvidas em interações mutualísticas com ácaros predadores: as domácias fornecem abrigo para oviposição e os ácaros provavelmente controlam artrópodes fitófagos e fungos patogênicos (Pemberton & Turner 1989, Karban *et al.* 1995, O'Dowd & Pemberton 1998, Matos *et al.* 2004, Rio *et al.* 2005, Mineiro *et al.* 2006). Essas estruturas podem tomar o aspecto de depressões, bolsas, sacos, ou mesmo tufos de tricomas na axila da nervura central, exclusivamente na superfície abaxial das folhas (Wilkinson 1979). A autora informa que esse termo também tem sido utilizado para a porção basal e revoluta da margem da folha de certas plantas, lembrando que Pemberton & Turner (1989) consideram ser este o tipo menos comum.

Estruturas secretoras podem ocorrer isoladas, constituindo idioblastos, ou em organizações multicelulares como epiderme, tricomas e nectários, dentre outras (Fahn 2000, Castro & Demarco 2008).

Convém ressaltar que Fahn (1974) enfatiza o uso das expressões 'nectário floral' e 'nectário extrafloral', respectivamente para designar as estruturas secretoras associadas às flores e à polinização e aquelas que ocorrem externamente às flores ou em órgãos vegetativos, não diretamente relacionadas à polinização. Entretanto, de acordo com Durkee (1982), Vesprini *et al.* (1999) e Castro & Machado (2003), apenas as estruturas que secretam açúcares são consideradas verdadeiros nectários.

Os nectários extraflorais geralmente constituem-se em fonte de nutrientes para formigas e outros insetos que protegem a planta contra o ataque de predadores herbívoros (McKey 1989, Castro & Machado 2003, Paiva & Machado 2006).

Assim, uma vez que plantas possuem características morfológicas e estruturais próprias, Barros & Teixeira (2008) mostraram ser possível diferenciar duas espécies de anileira através da análise da forma e da ornamentação de seus tricomas tectores; Fiuza *et al.* (2008) caracterizaram a epiderme foliar de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae); Martins *et al.* (2009) descreveram a estrutura foliar de *Tetradenia riparia*

(Hochst) Codd. (Lamiaceae), observando diferentes tipos de tricomas; e Rodrigues *et al.* (2009a) descreveram as folhas de *Senna alata*.

Sob este enfoque e, uma vez que pesquisadores de um dos projetos do programa BIOTA/FAPESP, no Instituto de Botânica de São Paulo, estão aprofundando os estudos fitoquímicos de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*, optou-se nesta pesquisa por contribuir para o seu conhecimento sob os aspectos estrutural e histoquímico, bem como realizar uma complementação em fitoquímica.



Figura 1. Exemplar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Foto da autora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo investigar a estrutura foliar e a localização *in situ* de compostos secundários, especialmente aqueles com atividade biológica de interesse farmacológico, em folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) Irwin & Barneby (Leguminosae – Caesalpinioideae), nas quais foram identificados alcalóides e flavonóides com atividades anticolinesterásica e antifúngica, por pesquisadores do Instituto de Botânica de São Paulo.

Deste modo, foram propostas as seguintes questões:

- 1) Há aspectos relacionados à estrutura anatômica de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* ainda não descritos que possam contribuir para uma identificação mais segura da referida subespécie? Neste caso, quais são eles?
- 2) Quais compostos secundários ocorrem nas folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*?
- 3) Em que tecidos foliares esses compostos secundários podem ser encontrados?

2.2. Objetivos específicos

Buscando elucidar as demandas acima relacionadas, este trabalho foi conduzido no sentido de:

- Caracterizar a organização estrutural das folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*;
- Verificar quais compostos secundários ocorrem em suas folhas;
- Indicar em quais tecidos os compostos secundários são encontrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos descritos em detalhes nos itens abaixo estão sumarizados nas figuras 2 e 3, para melhor visualização das etapas seguidas:

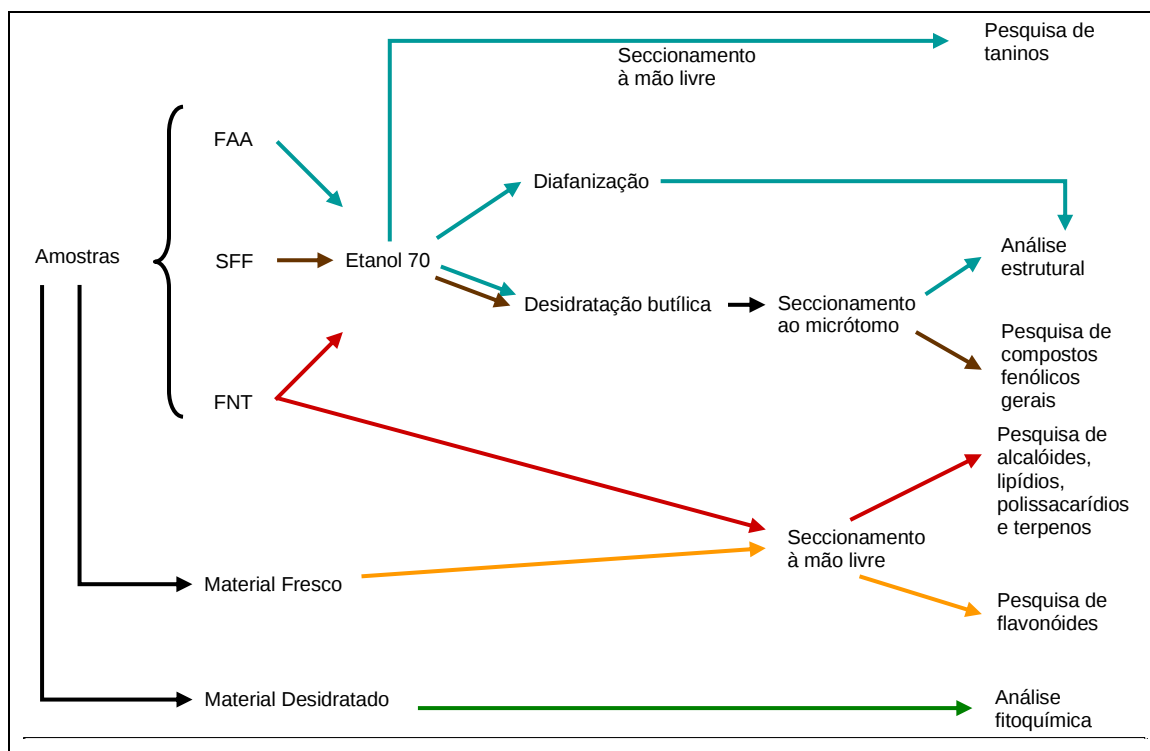


Figura 2. Fluxograma representativo do processamento ao qual foram submetidas as amostras de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.

3.1. Coleta

Foram selecionadas, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) – São Paulo, três árvores de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) Irwin & Barneby (Leguminosae Caesalpinioideae), cuja identificação foi confirmada pela taxonomista Dr^a Inês Cordeiro (Instituto de Botânica de São Paulo), (figura 2). De cada uma foram coletados três ramos para obtenção de amostras em triplicata (figura 4). As amostras de folhas (folíolos apicais, medianos e basais, ráquis, pecíolo e estrutura secretora basal) para as análises estruturais, fitoquímicas e histoquímicas foram obtidas entre o 10º e o 20º nós contados a partir da gema apical (figuras 5 e 6).

As coletas foram realizadas no verão, período em que as folhas encontram-se totalmente expandidas, uma vez que, segundo informações fornecidas por Silva & Young (2009, dados não publicados), o teor de alcalóides nesse órgão não sofre variações significativas ao longo das estações do ano.

Ramos férteis foram coletados para a produção de exsicatas, as quais estão depositadas no Herbário Joinvillea (JOI), da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) sob os registros 13-II-2007, C. Hering-Rinnert 1278 (JOI); 13-II-2007, C. Hering-Rinnert 1280 (JOI) e 27-II-2007, C. Hering-Rinnert 1285 (JOI).

3.2. Processamento do material

Algumas amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18, Johansen 1940) por 48 horas e, em seguida, armazenadas em etanol 70% (Johansen, 1940) (figuras 7-9). Posteriormente, esse material foi processado segundo técnicas usuais para observação de aspectos estruturais (Johansen, 1940) e para a localização *in situ* de taninos (figura 3).

Parte do material foi fixada em SFF (formaldeído, sulfato ferroso e água destilada) e submetida à desidratação etanólica para reconhecimento dos compostos fenólicos totais (Johansen 1940) (figuras 7-9).

Material fixado em FNT (formaldeído, fosfato de sódio dibásico heptaidratado, fosfato de sódio monobásico monoidratado e água destilada (Lillie 1948 *apud* Clark 1973)) foi utilizado para pesquisa de alcalóides, amido, lipídios, polissacarídeos e terpenos (figuras 7-9).

3.3. Análise estrutural

Alguns folíolos foram diafanizados segundo técnica de Strittmatter (1973, modificada por Pedroso 2006), posteriormente submetidos à coloração com azul de Astra aquoso 1% e safranina 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin, 1997), montados em glicerina 50% e observados em microscópio de luz. Registros foram feitos por meio de fotografias digitais para análise.

Fragmentos de folíolos, ráquis e pecíolos foram desidratados em série butanólica terciária crescente até butanol absoluto, emblocados em Paraplast MacCormick® (Johansen 1940) e seccionados seriadamente em micrótomo de rotação Olympus modelo Cut 4055 (figuras 10-14). As secções, com espessura de 12 µm, foram submetidas à coloração com azul de Astra aquoso 1% e safranina 1% em etanol 50% ((Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin, 1997).

Lâminas permanentes foram montadas segundo técnicas de Brito & Alquini (1996) e Gerlach (1969), empregando-se resina sintética Permount® (Kraus & Arduin, 1997). As secções obtidas ao micrótomo foram observadas ao microscópio de luz Zeiss modelo Axiostar *plus*, as estruturas registradas por meio de fotografias com câmera digital Canon PowerShot A650IS e analisadas em computador com o auxílio do programa AxioVision®.

3.4. Análise histoquímica

Material fixado em FNT foi utilizado para pesquisa de alcalóides, lipídios, polissacarídeos, terpenos e amido. Taninos foram pesquisados em material fixado em FAA.

Para a pesquisa de compostos fenólicos totais foi empregado material fixado em SFF. O material foi armazenado em etanol 70% e, posteriormente, desidratado em série butanólica terciária crescente até butanol absoluto, emblocado em Paraplast MacCormick® e seccionado seriadamente, com espessura de 12 µm, em micrótomo de rotação Olympus modelo Cut 4055 (Johansen 1940). Lâminas permanentes foram montadas segundo técnica de Brito & Alquini (1996) e Gerlach (1969), empregando-se resina sintética Permount® (Kraus & Arduin, 1997).

As análises histoquímicas foram realizadas por meio de testes específicos, sendo que, para cada classe de compostos secundários pesquisados, observou-se o material antes da aplicação do reagente (branco) e realizaram-se os controles negativos (tabela 1, figuras 15-20).

Tabela 1. Reagentes utilizados na histolocalização de compostos secundários em folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.

SUBSTÂNCIAS	REAGENTE	REAÇÃO POSITIVA	CONTROLE NEGATIVO
Alcalóides	Ellram, Dragendorff, Wagner (Furr & Mahlberg, 1981) Iodoplatinato (Wagner & Bladt 2001, Serrano 2006)	Coloração variando entre amarela, alaranjada e marron De róseo até vinho	Solução alcoólica de ácido tartárico 5% (Furr & Mahlberg 1981)
Compostos fenólicos gerais	SFF (Johansen 1940) Cloreto Férrico III (Johansen 1940)	Marrom escuro, negro	Metanol / clorofórmio / Água destilada / Ácido clorídrico (33:66:4:1) (Pearse 1980)
Flavonóides	Reagente Natural A (Schnitzler <i>et al.</i> 1996, Zuanazzi & Montanha 2007) AlCl ₃ (Costa 2000)	Laranja, amarelo ou verde, sob fluorescência Fluorescência (365 nm)	Metanol / clorofórmio / Água destilada / Ácido clorídrico (33:66:4:1) (Pearse 1980)
Lipídios ácidos e neutros	Sulfato Azul de Nilo (Ganter & Jollès 1969, 1970)	Azul a verde (lipídios ácidos) Rosa, púrpura, vermelho (lipídios neutros)	Metanol / clorofórmio / Água destilada / Ácido clorídrico (33:66:4:1) (Pearse 1980)
Polissacarídeos	Ácido periódico/reagente de Schiff (McManus 1948)	Rosa vivo	Omitir tratamento com ácido periódico
Taninos	Vanilina clorídrica (Mace & Howell 1974) Acetato de chumbo (Costa 2000)	Alaranjado a vermelho, Marrom Precipitado	Metanol (24h) (Ramsey & Berlin 1976)
Terpenos	Reagente de Liebermann-Burchard	Azul ou verde (núcleo esteroidal) Vermelho, rosa, púrpura ou violeta (núcleo triterpênico)	Metanol / Clorofórmio 1:1 (1h a 60°C) (Lison 1960)

As secções obtidas ao micróto, bem como aquelas produzidas à mão livre, foram observadas ao microscópio de luz Carl Zeiss modelo Axiostar *plus*, as estruturas registradas por meio de fotografias com câmara digital CanonPowerShot A650IS e analisadas em computador com o auxílio do programa AxioVision®.

Para a pesquisa de flavonóides foram analisadas secções à mão livre de material fresco (Figura 2) submetido aos reagentes Natural A e AlCl₃, observadas em microscópio binocular Carl Zeiss modelo Axioplan – 2 com dispositivo de epifluorescência acoplado (Schnitzer *et al.* 1996).

3.5. Análise fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar das folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* teve como objetivo direcionar os testes histoquímicos a serem realizados. Tal análise foi efetuada no Laboratório de Farmacognosia da UNIVILLE, sob a coordenação do farmacêutico Prof. MSc. Luciano Soares.

Para a análise fitoquímica, foram coletados 300 g de folhas das plantas selecionadas, as quais foram desidratadas naturalmente (figuras 2 e 3) e submetidas a métodos extrativos diferenciados.

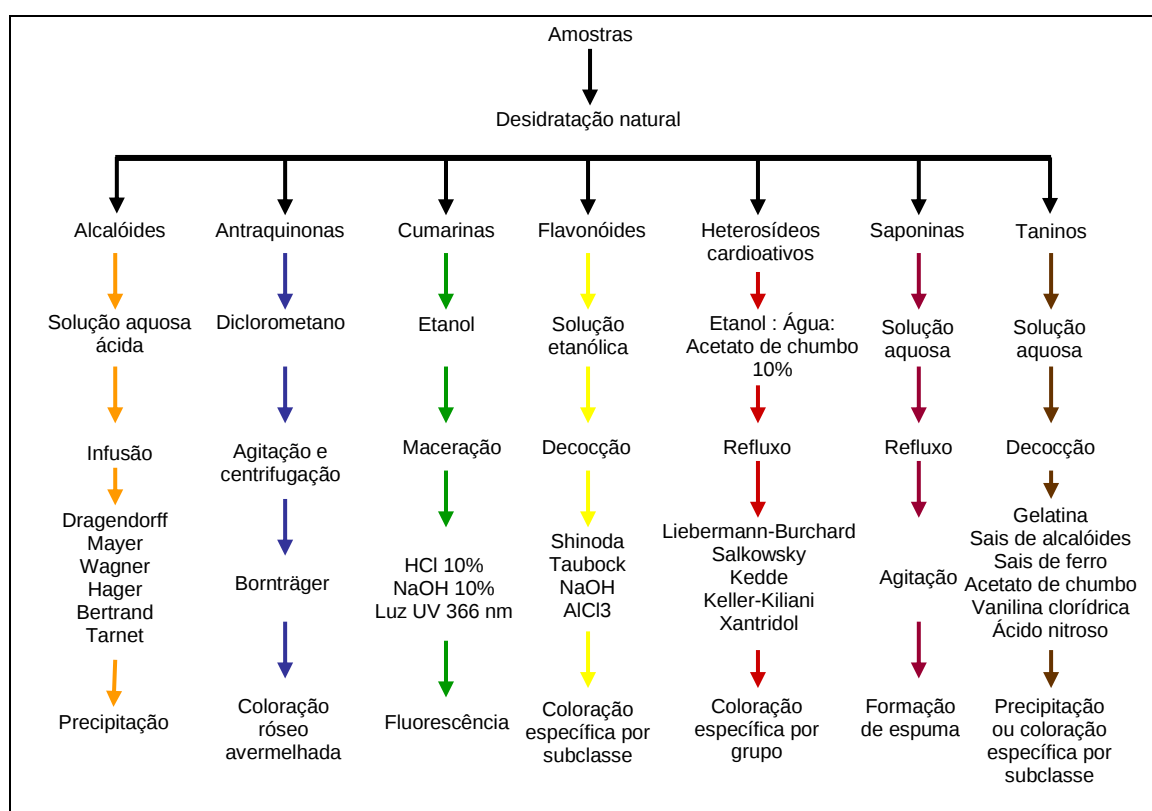


Figura 3. Fluxograma representativo da análise fitoquímica preliminar à qual foram submetidas as amostras de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.

Os processos extrativos aos quais as amostras foram submetidas encontram-se sumarizados na tabela 2. Foram pesquisados os seguintes grupos de compostos secundários: alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, heterosídeos cardioativos, saponinas e taninos (Costa 2000).

Tabela 2. Reagentes utilizados na análise fitoquímica de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*, segundo metodologia proposta por Costa (2000).

SUBSTÂNCIAS	MÉTODO EXTRATIVO	REAÇÕES	RESPOSTAS POSITIVAS
Alcalóides	Solução aquosa ácida Extração por infusão durante 2' com Ácido Sulfúrico 1%	Dragendorff Mayer Wagner Hager Bertrand Tarnet	Precipitação
Antraquinonas	Diclorometano Extração por agitação (5') seguida de centrifugação (2'/2000rpm) com diclorometano (T° ambiente)	Bornträger	Coloração rósea avermelhada
Cumarinas	Etanol Extração por maceração durante cerca de 5' com etanol comercial (96%) (T° ambiente)	HCl 10% NaOH 10% Luz UV 366 nm	Fluorescência
Flavonóides	Solução etanólica Extração por decocção durante 1 a 2' com etanol 70%	Shinoda Taubock NaOH AlCl ₃	Coloração específica por sub-classe Laranja-vermelha Desenvolvimento de cor Fluorescência
Heterosídeos cardioativos	Etanol : Água : Acetato de chumbo 10% (1:1:1) Extração por refluxo durante 15' com líquido extrator	Liebermann-Burchard Salkowsky Kedde Keller-Kiliani Xantridol	Azul, verde/vermelho-púrpura Castanho escuro-avermelhada Castanho avermelhada/vermelho violeta Anel marrom-avermelhado Vermelha
Saponinas	Solução aquosa Extração por refluxo durante 10' com água destilada	Agitar verticalmente e verificar se há formação de espuma	Desenvolvimento de espuma
Taninos	Solução aquosa Extração por decocção durante 15' com água destilada	Gelatina Sais de alcalóides Sais de ferro Acetato de chumbo Vanilina clorídrica Ácido nitroso	Formação de precipitado Formação de precipitado Azul ou verde Formação de precipitado esbranquiçado Alaranjada, vermelha Rosa a púrpura

Para a realização dos testes fitoquímicos foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: bequers para decocção e infusão, balão de refluxo e manta de

aquecimento para extração por refluxo, vidros de relógio para observar a formação de precipitados, tubos de ensaio para verificar as reações de coloração e funil de separação para a extração solvente-solvente. Além disso, para antraquinonas utilizou-se centrífuga (NOVA TÉCNICA ®) e para visualização de cumarinas, câmara de observação com lâmpada UV 366 nm.

Parte dos alcalóides foi testada através de pesquisa direta: o extrato obtido por meio de infusão foi distribuído em vidros de relógio e submetido aos reagentes de Dragendorff, Mayer, Wagner, Hager, Bertrand e Tarnet. Outra parte foi investigada por pesquisa indireta, que consiste num processo de purificação em que o extrato é alcalinizado com amônia diluída até pH 9-10, extraído com clorofórmio, e a fase clorofórmica é re-extraída, em funil de separação, com solução aquosa ácida - ácido sulfúrico 1%. A fase aquosa da re-extração foi testada com os mesmos reativos utilizados na fase direta (Costa 2000).

Os resultados obtidos (reações de precipitação e de coloração) foram comparados com aqueles apresentados por plantas cuja composição química é conhecida (alcalóides: *Atropa belladonna* L.; antraquinonas: *Rhamnus purshiana* DC; cumarinas: *Citrus limon* (L.) Burm. f.; flavonóides: *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, heterosídeos cardioativos: *Nerium oleander* L.; saponinas: *Polygala senega* L.; e taninos: *Psidium guajava* L.).



Figuras 4-14. Etapas da coleta e processamento das amostras. 4. Espécime de *Senna multijuga*. 5-6. Ramos. 6. Ramo subdividido em região basal, mediana e apical. 7. Folíolos basais (A), medianos (B), apicais (C), ráquis (D) e folíolo subdividido em região apical, mediana e basal (E). 8. Fixação das amostras com submissão à bomba a vácuo. 9. Armazenamento. 10-11. Material emblocado em paraplast para secçãoamento. 12. Micrótomo de rotação e secçãoamento das amostras. 13. Distensão das secções em placa aquecedora. 14. Lâminas prontas em laminário.

4. RESULTADOS

Senna multijuga subsp. *lindleyana* apresenta folhas compostas pinadas decíduas no inverno, período em que o clima é seco. Os folíolos têm a base levemente assimétrica, com lado interno revoluto e ápice mucronado curvo; a margem é inteira, as superfícies são discolores, lisas e fraco-pubescentes e a consistência é fracamente coriácea (figuras 21-26). Estruturas secretoras ocorrem na superfície adaxial da ráquis, preferencialmente entre os folíolos basais, podendo ser observadas também entre os demais pares de folíolos (figura 21).

A análise fitoquímica direcionou a realização dos testes histoquímicos, cujos resultados demonstraram a ampla distribuição dos compostos secundários nos tecidos foliolares e na estrutura secretora (tabelas 3-6).

Os compostos secundários investigados foram encontrados especialmente na base dos folíolos, na ráquis e no pecíolo da folha; sempre na epiderme, nos tecidos parenquimáticos e nos elementos condutores do floema (tabelas 3-5, figuras 51-69, 76-90, 97-108).

Não foi possível observar alcalóides em quaisquer outras partes da folha, além dos tecidos do floema (figuras 51-54, 76-77, 97-98). Verificou-se, também, um maior acúmulo dessas substâncias na base dos folíolos basais, ráquis correspondente, pecíolo e estrutura secretora, indicando a existência de um eficiente sistema de transporte no sentido descendente (fonte-dreno).

Compostos fenólicos foram observados especialmente no parênquima da espécie, contidos em idioblastos (figuras 55-56, 74, 78, 84-86, 99-100).

Sob fluorescência, compostos fenólicos foram identificados nos tricomas tectores dos folíolos, ráquis e pecíolo, bem como nos parênquimas paliádico e lacunoso (figuras 57-60, 80-81). As colorações provocadas pela fluorescência variaram em cada tecido, sugerindo que se trate de diferentes classes de flavonóides.

4.1. Folíolos

O padrão de venação observado nos folíolos de *S. multijuga* subsp. *lindleyana* é camptódromo-broquidódromo com nervura última marginal incompleta, ou

seja, as nervuras secundárias não terminam na margem e anastomosam-se entre si, formando uma série de arcos proeminentes (figuras 22-23).

Todos os folíolos da espécie estudada apresentam margem basal interna revoluta e coberta por tricomas tectores, no interior da qual foram encontrados pequenos animais. Estruturas com essas características constituem-se em domácias, as quais ainda não haviam sido relatadas para a espécie (figuras 24-26).

A epiderme é uniestratificada e apresenta, na porção adaxial do folíolo, células com paredes anticlinais retas, sendo o contorno celular poligonal, com predomínio das formas retangulares (figuras 27, 29). As células da epiderme na porção abaxial apresentam contorno sinuoso, com diferentes orientações e formas (figuras 28, 30-31).

Em secção transversal, as células da epiderme da superfície adaxial mostram paredes periclinais externas retas ou levemente convexas e com aspecto quadrangular (figuras 27, 32). Na porção abaxial as células têm aspecto papiloso (figura 27).

Estômatos são observados somente na superfície abaxial dos folíolos (figuras 27-28, 30-31). Predomina o arranjo paracítico, mas também foram observados os arranjos anisocíticos e anomocíticos (figuras 28, 30-31). As células-guarda se localizam em nível mais baixo que as células subsidiárias, apresentando aspecto papiloso (figura 27).

Observou-se a presença de tricomas tectores em ambas as superfícies dos folíolos (figuras 24, 33-36), especialmente na abaxial, próximo à sua base, e em grande quantidade na margem revoluta, associados às domácias (figuras 24-25, 37). Mais frequentes ao longo das bordas e da nervura central, os tricomas têm sua ocorrência reduzida em direção ao ápice.

Os tricomas tectores estão inseridos entre cinco a oito células basais, dispostas radialmente. Os tricomas apresentam superfície lisa, parede levemente espessada, base ligeiramente dilatada e célula terminal afilada, são unisseriados e constituídos por até cinco células (figuras 33-34, 36-37).

Raros tricomas glandulares foram observados (figura 38). São do tipo capitado, ocorrendo principalmente próximos à nervura central, em ambas as superfícies foliolares e na porção interna da domácia.

Fibras esclerenquimáticas formam uma bainha no entorno dos feixes vasculares do mesofilo foliolar (figura 39). Na nervura central, essas fibras constituem

um esclerênquima com quatro a cinco camadas amplas na porção dorsal do mesofilo e cinco a seis camadas mais estreitas na porção ventral (figuras 40-41).

Colênquima anelar é observado na nervura central, apenas em sua superfície abaxial, formando um cordão subepidérmico com duas a quatro camadas celulares (figura 41).

Na porção adaxial da nervura central há apenas uma estreita camada de parênquima paliçádico (figura 40). Quatro a cinco camadas de células de parênquima de preenchimento ocorrem na porção abaxial, nas quais são observados inúmeros idioblastos com conteúdos orgânicos diversos e cristais (figura 41).

A lâmina foliolar dorsiventral tem parênquima paliçádico com apenas uma camada de células, muito ricas em inclusões orgânicas (figuras 43-43). Essas células são curtas na região da nervura central, tendo seu comprimento aumentado em direção às bordas (figuras 40, 42-44). O parênquima lacunoso apresenta de três a oito camadas de células, frouxamente arrançadas (figuras 42-43).

Idioblastos secretores estão presentes em grande quantidade em todas as regiões do folíolo (figuras 39-44). São mais abundantes nas células epidérmicas da superfície adaxial do que nas da superfície abaxial, nas quais o conteúdo é arredondado, com aspecto de pequenas gotas, apenas uma por célula, na maioria delas (figuras 27, 32). No mesofilo, o conteúdo toma o formato das células, mostrando-se elíptico no parênquima paliçádico e esférico no parênquima lacunoso, com aspecto granuloso, hialino ou escuro, sugerindo constituírem-se de compostos fenólicos (figuras 39-44).

Cristais de dois tipos foram observados. Drusas foram detectadas em maior quantidade na região da nervura central, nas porções dorsal e ventral do mesofilo e, de forma escassa, em células epidérmicas e subepidérmicas (figuras 45-46). Cristais prismáticos estão distribuídos predominantemente na região dorsal da nervura central, ocorrendo também próximos aos feixes vasculares menores, igualmente na região dorsal do folíolo (figuras 47-48).

Grãos de amido são raros no limbo foliolar, ocorrendo quase que exclusivamente nas células-guarda dos estômatos (figura 49). Ocasionalmente, os grãos de amido foram observados na base dos folíolos, formando uma bainha amilífera ao redor da nervura central (figura 50).

Na lâmina foliolar, substâncias compatíveis com alcalóides foram evidenciadas unicamente no floema e tecidos associados, enquanto que compostos

fenólicos, polissacarídeos e terpenos mostraram maior distribuição, tendo sido encontrados em quase todos os tecidos (tabela 3; figuras 51-69).

Lipídios de caráter ácido foram observados em grande quantidade, com destaque para a epiderme, na qual ocorriam sob a forma de gotas, sugerindo encontrarem-se restritos aos vacúolos (figuras 65-66). A presença de carotenóides pode explicar a grande quantidade de idioblastos de colocação amarelada observada em secções de material fresco, que mostraram reação positiva ao teste para lipídios (figura 66).

Tabela 3. Localização *in situ* de compostos secundários em lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Resultados: (-) negativo, (+) fraco positivo; (++) positivo; (+++) forte positivo. (*) Parênquima dos feixes vasculares.

SUBSTÂNCIA EVIDENCIADA	TECIDO				
	Epiderme	Parênquima Paliçádico	Parênquima Lacunoso	Floema	Xilema
Alcalóides (iodoplatinato)	-	-	-	++	-
Compostos fenólicos gerais (SFF e Cloreto Férrico III)	-	+++	++	+++*	+++*
Flavonóides (Reagente Natural A e Cloreto de Alumínio)	+++	++	+	-	-
Lipídios ácidos e neutros (Azul do Nilo)	+++	+	++	+	-
Polissacarídeos (Ácido periódico / reagente de Schiff)	+	+++	++	+++*	+++*
Taninos (Vanilina Clorídrica e Acetato de Chumbo)	-	+	+	+++*	+++*
Terpenos (Reagente de Liebermann- Burchard)	+	+++	+++	+++*	+++*

4.2. Ráquis e Pecíolo

A ráquis apresenta-se acanalada na superfície adaxial e arredondada na abaxial, aveludada, flexível e macia, com coloração variando de verde-claro para marrom na maturidade (figuras 20-21, 70).

Estruturalmente, a ráquis é constituída por epiderme frequentemente papilosa, parênquima cortical com quatro a seis camadas celulares, esclerênquima com quatro a sete camadas, eventualmente colênquima anelar com duas a três camadas na superfície abaxial, tecidos vasculares e parênquima medular (figura 70).

Idioblastos cristalíferos e outros contendo compostos orgânicos ocorrem nos tecidos parenquimáticos (figuras 74). As drusas foram observadas no parênquima cortical, no esclerênquima e no parênquima do xilema, sendo que a quantidade varia de poucas a muito frequentes. Os cristais prismáticos são menos comuns, ocorrendo externamente ao esclerênquima, preferencialmente na região dorsal da ráquis. De um modo geral, a presença de cristais é maior na ráquis do que no limbo foliolar.

Grãos de amido podem ser observados no parênquima medular (figura 72) e ocasionalmente formando bainha amilífera no entorno da nervura central, como no folíolo.

O pecíolo se mostra como uma continuidade da ráquis, apresentando essencialmente as mesmas características morfológicas: superfície adaxial acanalada e abaxial arredondada na base, mas carenada na porção terminal (figura 71). Estruturalmente, apresenta epiderme papilosa, parênquima cortical com cinco a seis camadas celulares, esclerênquima com três a oito camadas celulares e, em sua porção basal, observa-se de três a quatro camadas celulares de colênquima anelar entre a epiderme e o parênquima cortical, no qual ocorrem muitas células secretoras (figuras 73, 75). O aspecto e disposição dos feixes vasculares e parênquima medular seguem o mesmo padrão observado na ráquis (figura 73).

Da mesma forma que na lâmina foliolar, compostos secundários diversos foram observados na ráquis e no pecíolo (ver tabela 4; figuras 76-90). Substâncias compatíveis com alcalóides foram evidenciadas na ráquis e no pecíolo, restringindo-se ao floema (tabela 4; figuras 76-77). Fluorescência após tratamento com reagente Natural A foi observada em porções da ráquis e pecíolo que parecem ter sofrido dano, sugerindo que, em *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, determinados flavonóides possam ter ação cicatrizante ou antimicrobiana (figuras 80-81).

Tabela 4. Localização *in situ* de compostos secundários em ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Resultados: (-) negativo; (+) fraco positivo; (++) positivo; (+++) forte positivo. (*) Parênquima dos feixes vasculares.

SUBSTÂNCIA EVIDENCIADA	TECIDO					
	Epiderme	Parênquima Clorofiliano	Parênquima Cortical	Parênquima Medular	Floema	Xilema
Alcalóides (iodoplatinato)	-	-	-	-	+++	-
Compostos fenólicos gerais (SFF e Cloreto Férrico III)	-	+	+++	+	+++*	+++*
Flavonóides (Reagente Natural A e Cloreto de Alumínio)	+	++	+	-	+	-
Lipídios ácidos e neutros (Azul do Nilo)	-	++	+++	+	+	+
Polissacarídeos (Ácido periódico / reagente de Schiff)	-	++	++	+	+++*	+*
Taninos (Vanilina Clorídrica e Acetato de Chumbo)	-	+	++	+	+++*	+++*
Terpenos (Reagente de Liebermann- Burchard)	-	++	+++	+	+++*	+++*

Polissacarídeos foram observados nos tecidos da ráquis e do pecíolo, que também se caracterizam por concentrar maior quantidade de idioblastos contendo substâncias compatíveis com taninos e terpenos (figuras 82-90).

Idioblastos com conteúdo lipídico e substâncias compatíveis com terpenos foram observados em maior quantidade nos parênquimas corticais e clorofilianos, sendo que os terpenos também ocorrem nos tecidos associados ao floema (figuras 89-90).

4.3. Estrutura Secretora

Na folha adulta estruturas secretoras se localizam preferencialmente entre os folíolos basais, podendo ocorrer também entre os folíolos apicais ou próximos a estes (figura 21). Consistem em estruturas cônicas, com 3-5 mm de comprimento, projetando-

se perpendicularmente da ráquis (figura 91). A secreção parece ser liberada por um poro apical. Essas estruturas são constituídas por uma epiderme com células levemente alongadas, em secção transversal (figura 93). Os parênquimas cortical e medular são ricos em idioblastos (figuras 92, 94). No parênquima medular, floema e xilema estão distribuídos aleatoriamente, assim como as fibras esclerenquimáticas. Grãos de amido ocorrem de forma esparsa no interior das células parenquimáticas (figura 95). Raros cristais do tipo drusa foram observados no parênquima cortical (figura 96).

Tabela 5. Localização *in situ* de compostos secundários em estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Resultados: (-) negativo; (+) fraco positivo; (++) positivo; (+++) forte positivo. (*) Parênquima dos feixes vasculares.

SUBSTÂNCIA EVIDENCIADA	TECIDO				
	Epiderme	Parênquima Cortical	Parênquima Medular	Floema	Xilema
Alcalóides (iodoplatinato)	-	-	-	+++	-
Compostos fenólicos gerais (SFF e Cloreto Férrico III)	+++	+++	++	-	-
Lipídios ácidos e neutros (Azul do Nilo)	+++	+++	++	-	-
Polissacarídeos (Ácido periódico / reagente de Schiff)	+++	+++	++	-	-
Taninos (Vanilina Clorídrica e Acetato de Chumbo)	+	+++	+	-	-
Terpenos (Reagente de Liebermann- Burchard)	+++	+++	++	-	-

As estruturas secretoras apresentam em seus tecidos as mesmas substâncias localizadas nas demais partes da folha (tabela 5; figuras 97-108). Os compostos secundários foram observados circunscritos às células, em grandes vacúolos, não ocupando espaços intercelulares (figuras 97-108).

Muito embora tenham sido evidenciados polissacarídeos na estrutura secretora, estudos mais profundos se fazem necessários para verificar se essas

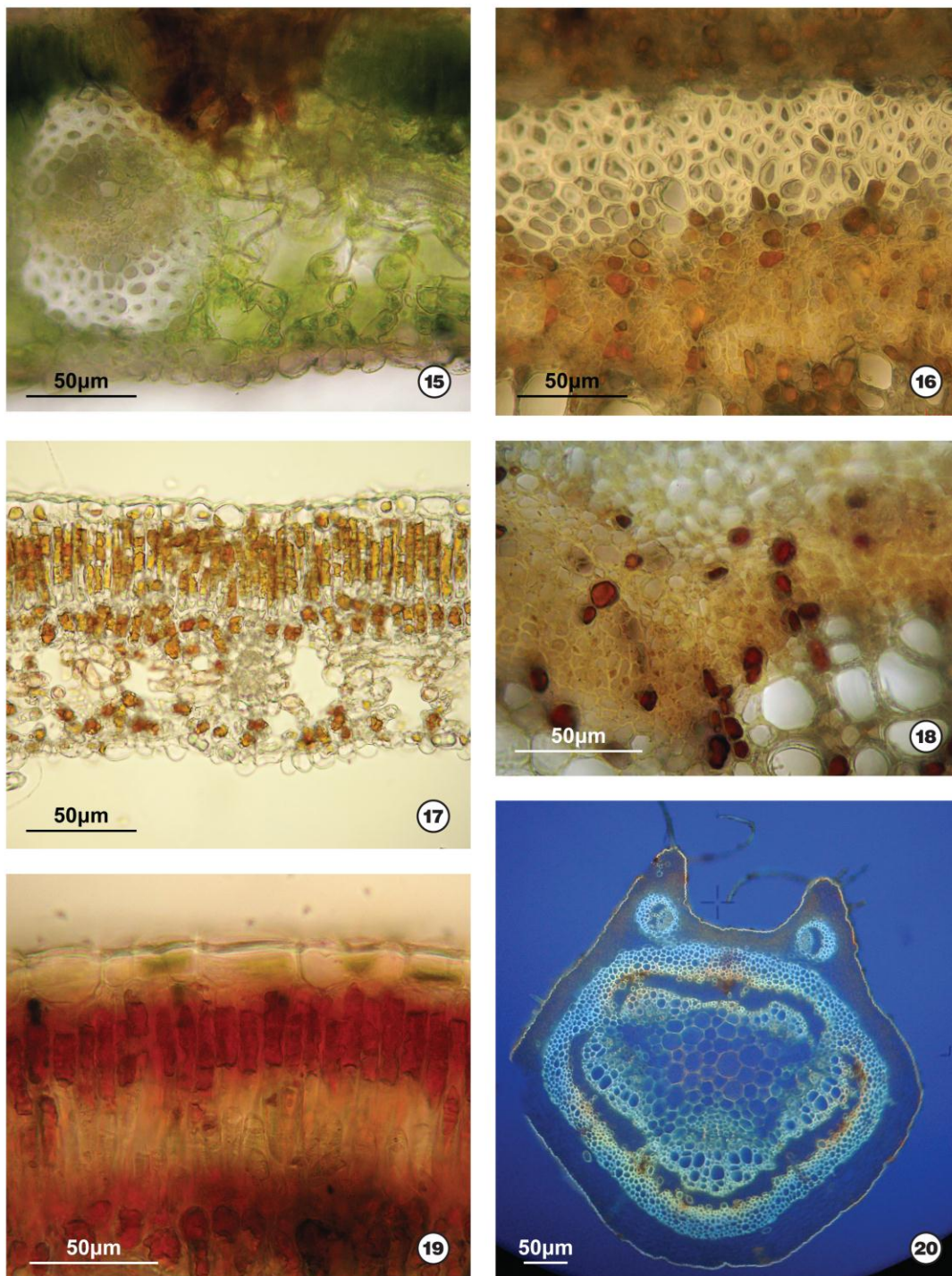
substâncias são convertidas a açúcares simples, o que caracterizaria tal glândula, considerando o exsudado, como nectário.

4.4. Análise Fitoquímica

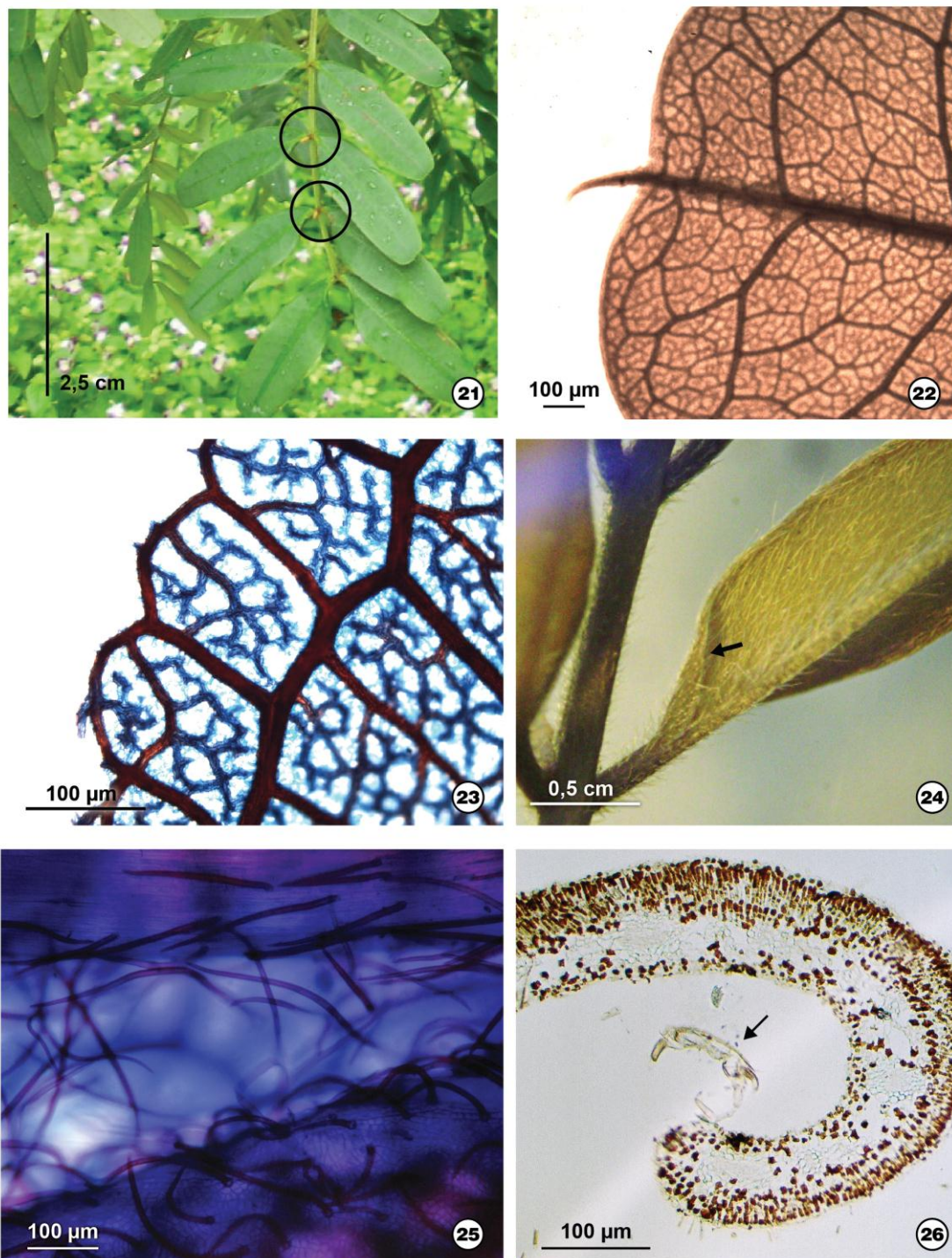
A análise fitoquímica de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* revelou a provável presença de alcalóides, flavonóides, heterosídeos cardioativos, taninos, e saponinas, estas últimas em pequena quantidade. As amostras testadas não apresentaram antraquinonas e os ensaios foram inconclusivos para cumarinas (tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise fitoquímica preliminar de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*.

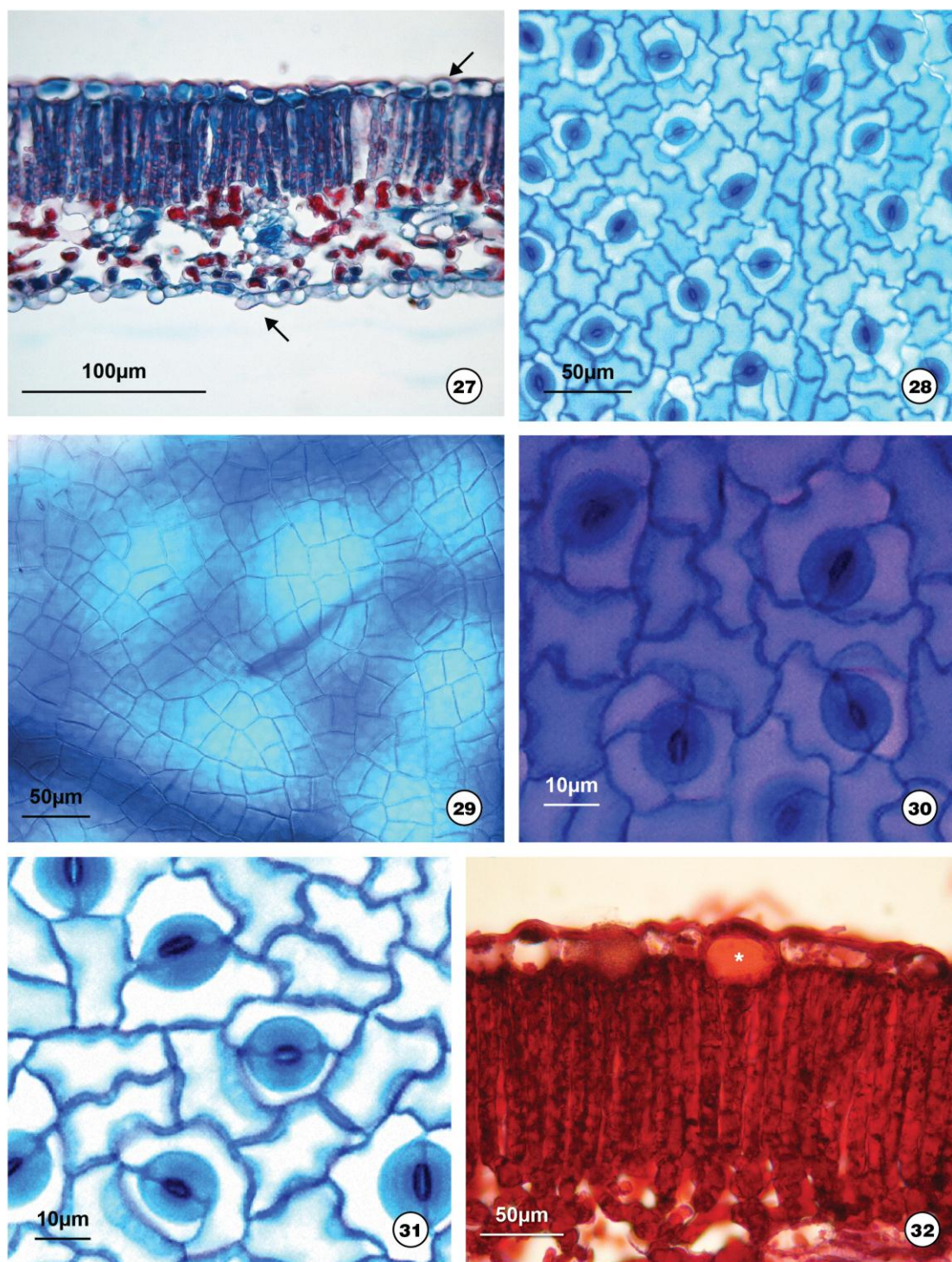
SUBSTÂNCIAS	REAÇÃO	RESPOSTA POSITIVA	RESPOSTA OBTIDA
Alcalóides	Dragendorff	Precipitação (em pesquisas direta e indireta)	+
	Mayer		+
	Wagner		+
	Hager		+
	Bertrand		+
	Tarnet		+
Antraquinonas	Bornträger	Coloração róseo avermelhada	-
Cumarinas	HCl 10%	Fluorescência	+ / -
	NaOH 10%		
	Luz UV 366 nm		
Flavonóides	Shinoda	Coloração específica por sub-classe	+ (flavonas)
	Tauböck	Laranja-vermelha	+ (flavonóis)
	NaOH	Desenvolvimento de cor	+ (flavonas e flavonóis)
	AlCl ₃	Fluorescência	-
Heterosídeos cardioativos	Liebermann-Burchard	Azul, verde/vermelho-púrpura	+
	Salkowsky	Castanho escuro-avermelhada	+
	Kedde	Castanho avermelhada/ vermelho violeta	+
	Keller-Kiliani	Anel marrom-avermelhada	+
	Xantridol	Vermelha	-
Saponinas	Agitar verticalmente e verificar se há formação de espuma	Desenvolvimento de espuma	+
Taninos	Gelatina	Formação de precipitado	-
	Sais de alcalóides	Formação de precipitado	+
	Sais de ferro	Azul ou verde	+ (taninos hidrolisáveis)
	Acetato de chumbo	Formação de precipitado esbranquiçado	+ (taninos hidrolisáveis)
	Vanilina clorídrica	Alaranjada, vermelha	+ (taninos condensados)
	Ácido nitroso	Rosa a púrpura	-



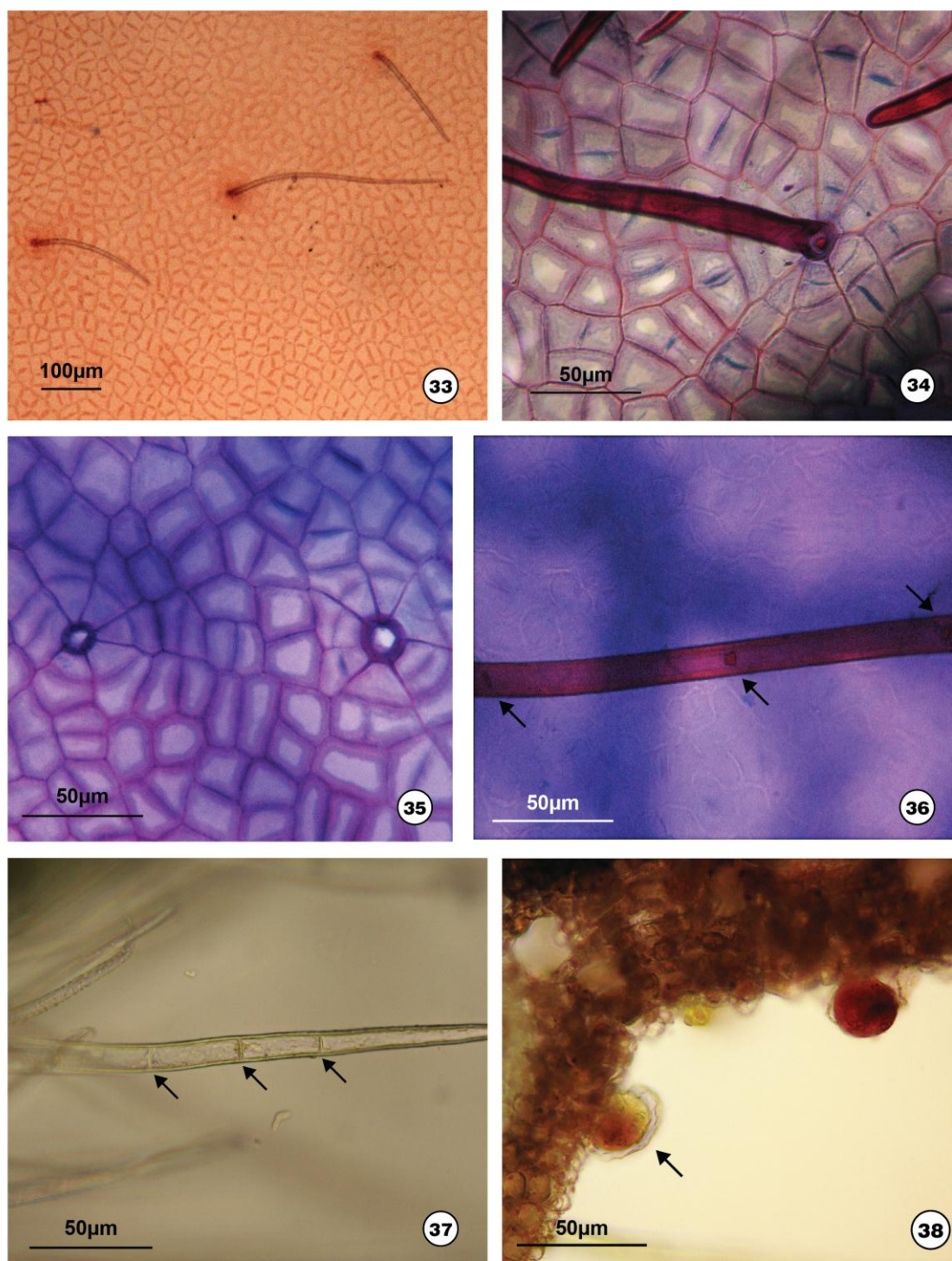
Figuras 15-20. Folíolos de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*. Branco e controles negativos para alcalóides, polissacarídeos e flavonóides. 15. Ao natural. 16-17. Branco. 18-20. Controles negativos. 15-16, 18-20. Secções a mão livre. 17. Secção ao micrótomo. 15, 20. Material fresco. 16, 18-19. Material fixado em FNT. 17. Material fixado em FAA e emblocado em paraplast. 18. Controle negativo para alcalóides. 19. Controle negativo para polissacarídeos. 20. Controle negativo para flavonóides.



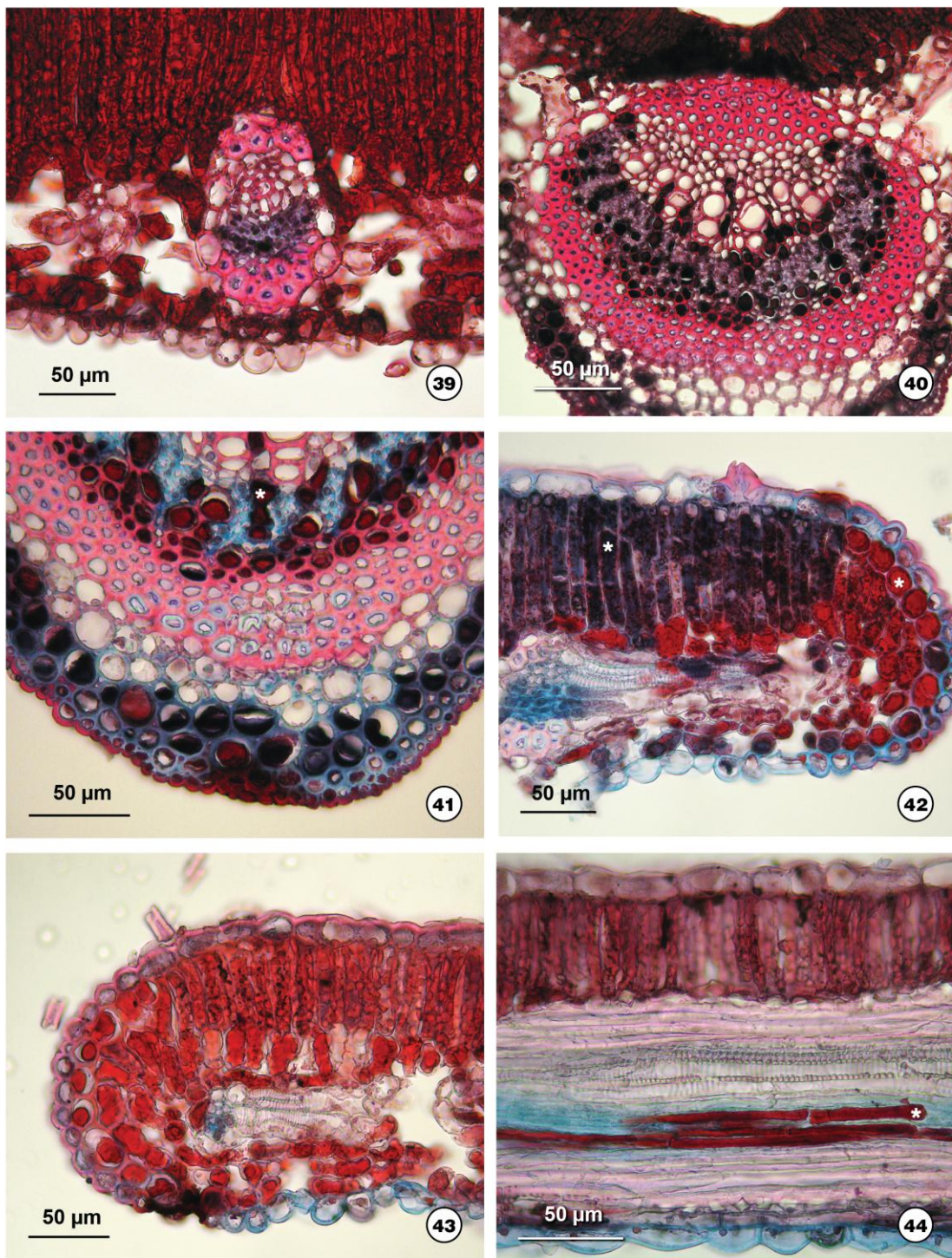
Figuras 21-26. Folhas e folíolos de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*. 21, 24. Aspectos morfológicos das folhas. 22-23, 25. Folíolos diafanizados em vista frontal. 26. Secção transversal de material fixado em sulfato ferroso e formalina. 21. Estruturas secretoras (círculos). 22. Ápice mucronado curvo. 23. Padrão de nervação da borda foliolar. 24. Base assimétrica de folíolo jovem (seta). 25. Aspecto frontal da domácia. 26. Animal no interior da domácia (seta). 21. Material *in vivo*. Fixação. 22-25. FAA. 26. SFF. Coloração. 21-22, 24, 26. Ao natural. 23, 25. Safranina e azul de Astra.



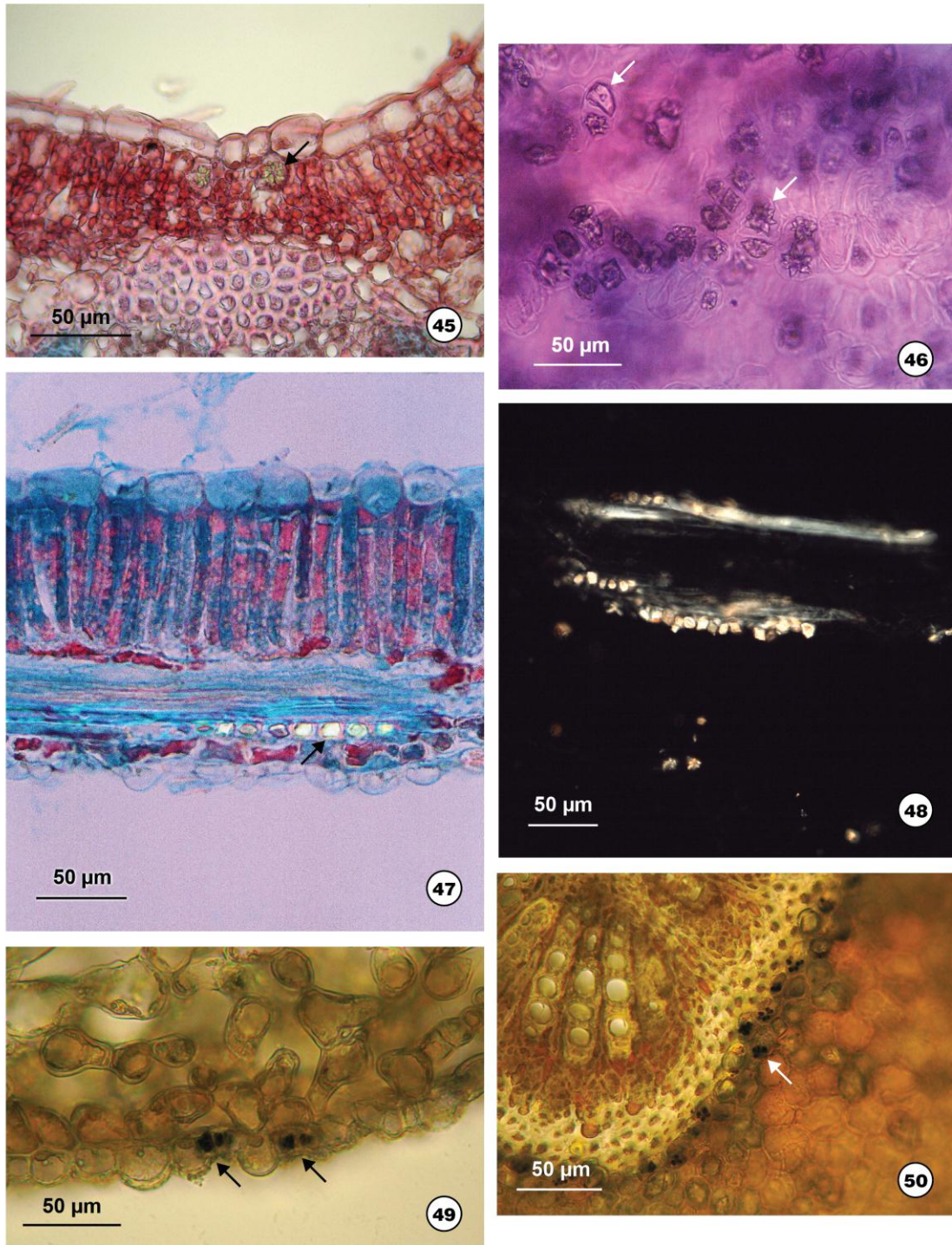
Figuras 27-32. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Epiderme e estômatos. 27, 32. Secções transversais. 28-31. Secções paradérmicas. 27. Aspecto da lâmina foliolar evidenciando a epiderme das superfícies adaxial e abaxial do folíolo (setas) e estômato (asterisco). 28. Epiderme da superfície abaxial com estômatos 29. Epiderme da superfície adaxial. 30-31. Estômatos paracíticos e anisocíticos. 32. Aspecto da epiderme na superfície adaxial do folíolo evidenciando idioblasto com conteúdo (asterisco). Coloração: 27-31. Safranina e azul de Astra. 32. Safranina.



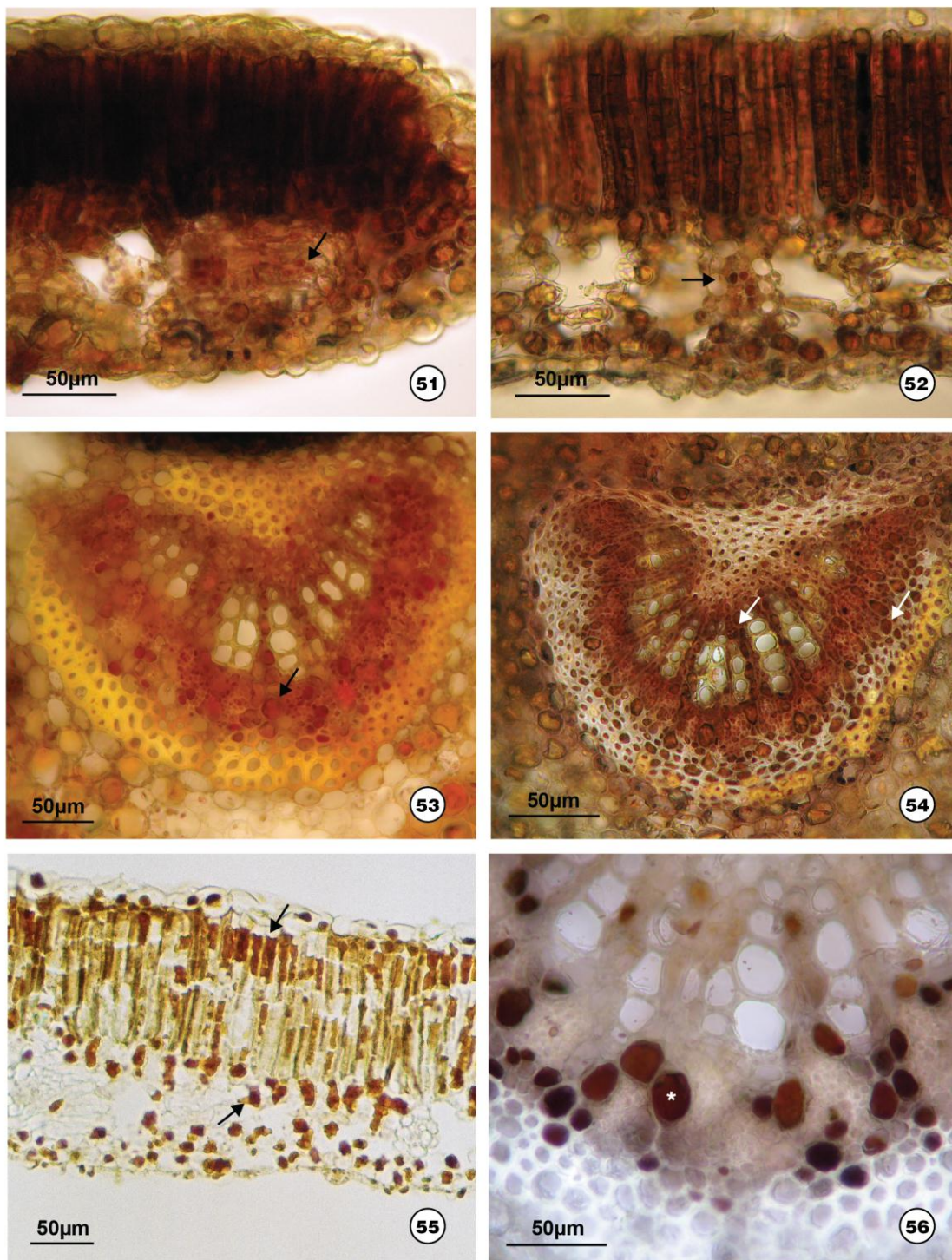
Figuras 33-38. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Tricomas. 33-35. Secções paradérmicas da epiderme na superfície adaxial do folíolo. 36. Secção paradérmica da epiderme na superfície abaxial do folíolo. 37-38. Secções transversais. 33. Aspecto da disposição dos tricomas tectores. 34. Detalhes da base dos tricomas tectores. 35. Disposição das células basais dos tricomas tectores. 36-37. Tricomas tectores multicelulares, evidenciando as paredes entre as células (setas). 38. Tricomas glandulares, com destaque para a cutícula (seta). Coloração: 33-36. Safranina e azul de Astra. 37. Ao natural. 38. Iodoplatinato.



Figuras 39-44. Lâmina foliolar de *Senna multijuga*. Secções transversais. 39. Mesófilo com destaque para feixe vascular. 40. Aspecto da nervura central. 41. Detalhe da região abaxial da nervura central do folíolo evidenciando epiderme, colênquima anelar e idioblastos no parênquima e no tecido floemático (asterisco). 42. Margem do folíolo com destaque para as células secretoras no mesófilo (asterisco). 43. Detalhe da margem do folíolo. 44. Nervura em vista longitudinal, evidenciando idioblastos no floema (asterisco). Coloração: azul de Astra e safranina.



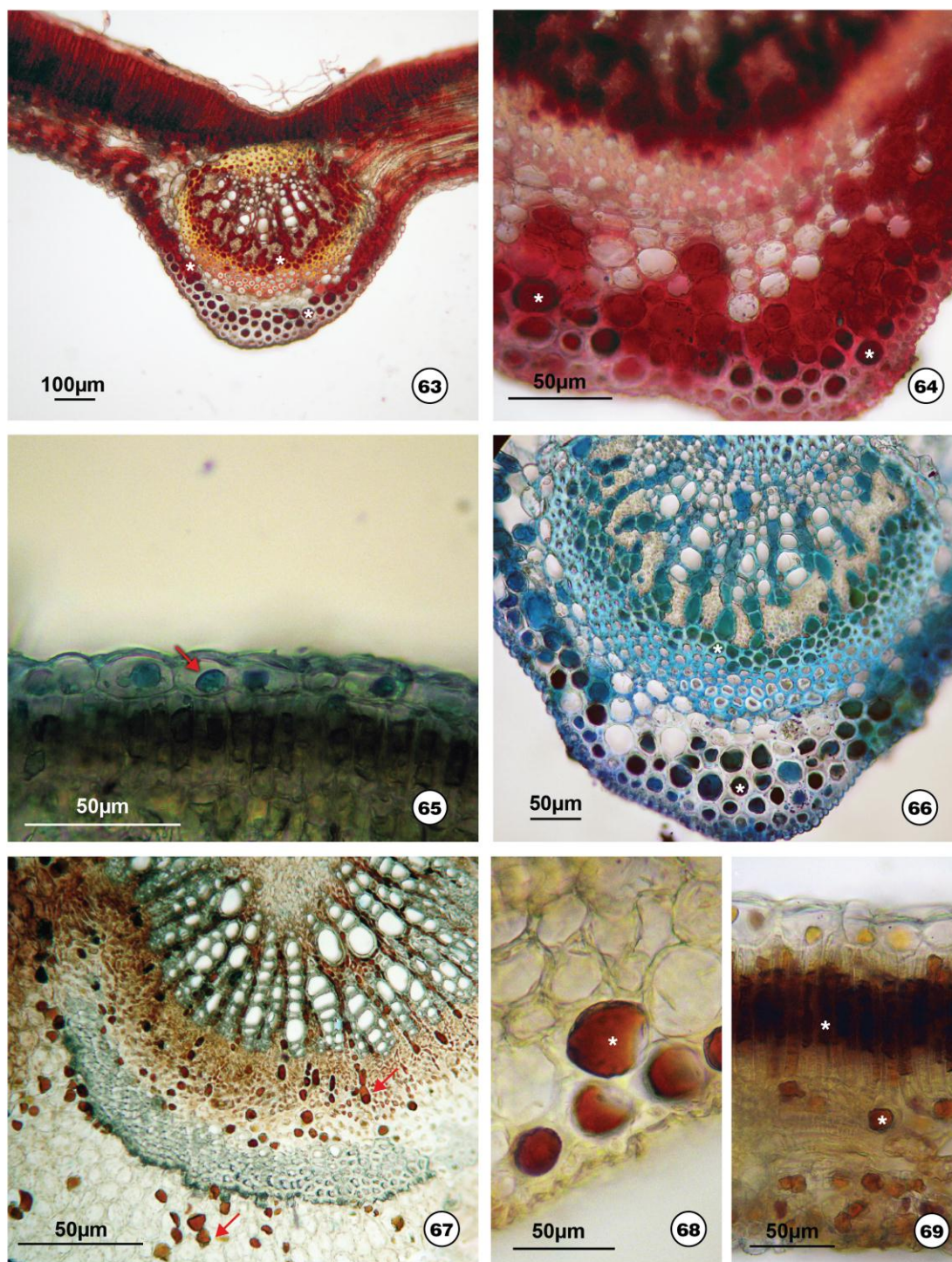
Figuras 45-50. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Cristais e grãos de amido. 45, 47-50. Seções transversais. 46. Material diafanizado. 45-46. Drusas em células subepidérmicas na região da nervura central do folíolo (setas). 47-48. Cristais prismáticos ao longo da nervura sob luz polarizada. 49. Estômatos com grãos de amido nas células-guarda (setas). 50. Bainha amilífera ao redor da nervura na base do folíolo (seta). Coloração: 45-47. Safranina e azul de Astra. 48. Sem coloração. 49-50. Lugol.



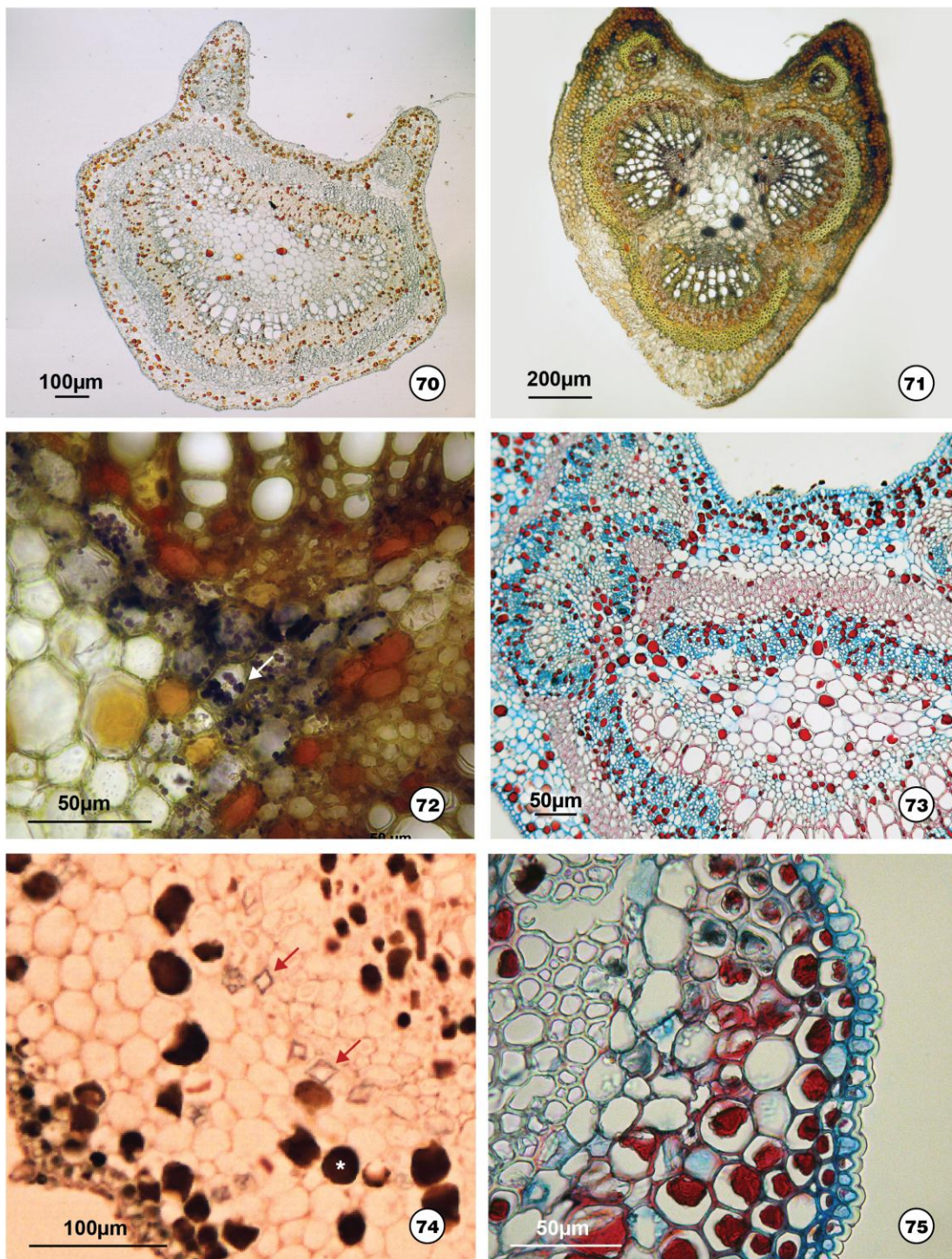
Figuras 51-56. Distribuição dos compostos secundários na lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. 51-52. Lâmina foliolar, evidenciando alcalóides em células parenquimáticas do floema (setas). 53-54. Nervura central do mesófilo foliolar, evidenciando alcalóides em células parenquimáticas do floema (setas). 55. Lâmina foliolar, com idioblastos fenólicos nos parênquimas paliádico e lacunoso (setas). 56. Nervura central do mesófilo foliolar com compostos fenólicos no parênquima do floema (asterisco). Fixadores. 51-54, 56. FNT. 55. SFF. Reagentes. 51-54. Iodoplatinato. 56. Cloreto férrico.



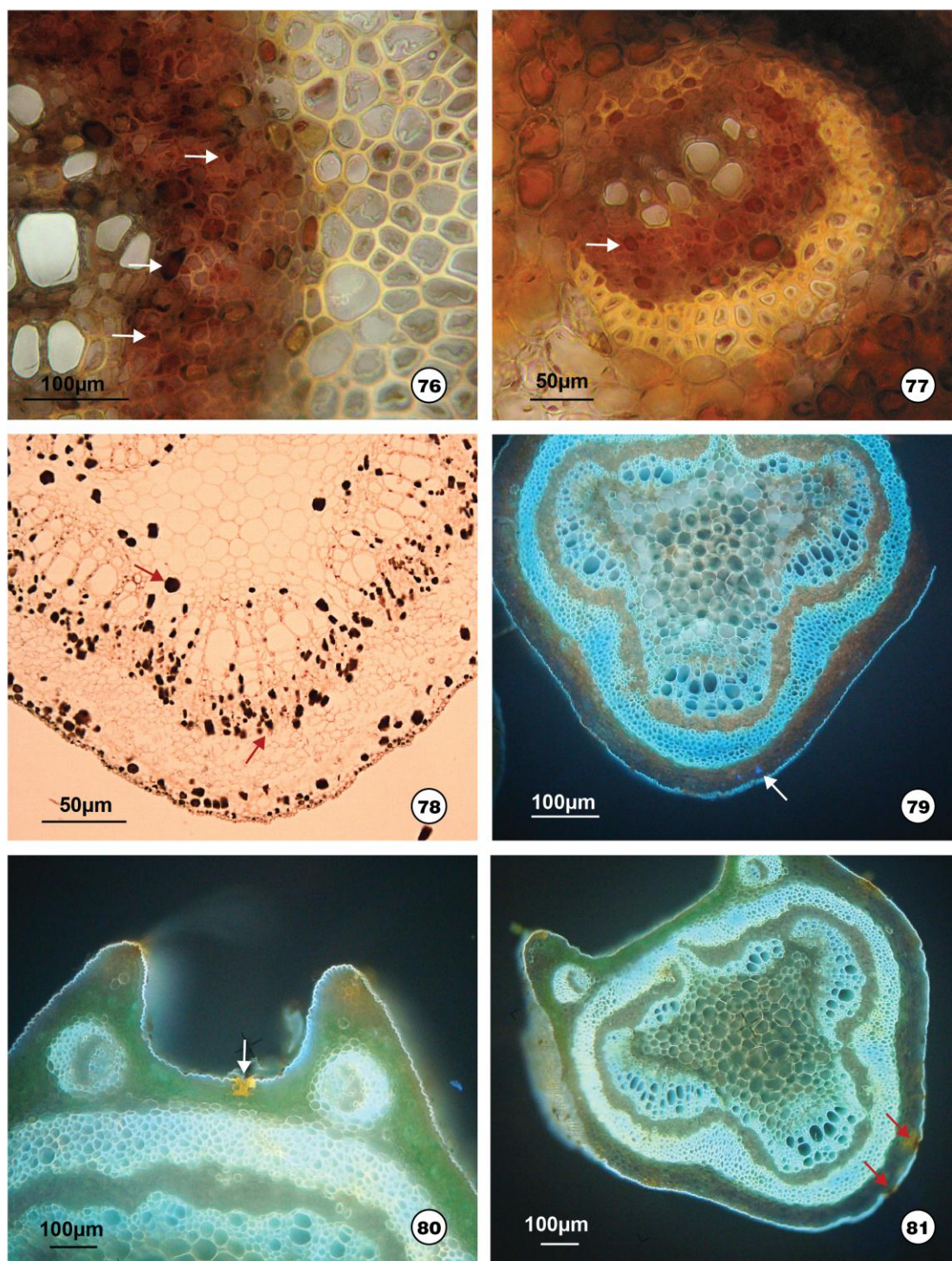
Figuras 57-62. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. 57-60. Flavonóides sob fluorescência na epiderme e parênquima (setas e asteriscos). 61. Taninos na camada subepidérmica (asterisco). 62. Nervura central, com destaque para taninos no parênquima do floema (asterisco). 57-58, 60. Material fresco. 59. Fixador FNT. 61-62. Fixador FAA. Reagentes. 57-59. Reagente Natural A. 60. Cloreto de alumínio. 61. Vanilina clorídrica. 62. Acetato de chumbo.



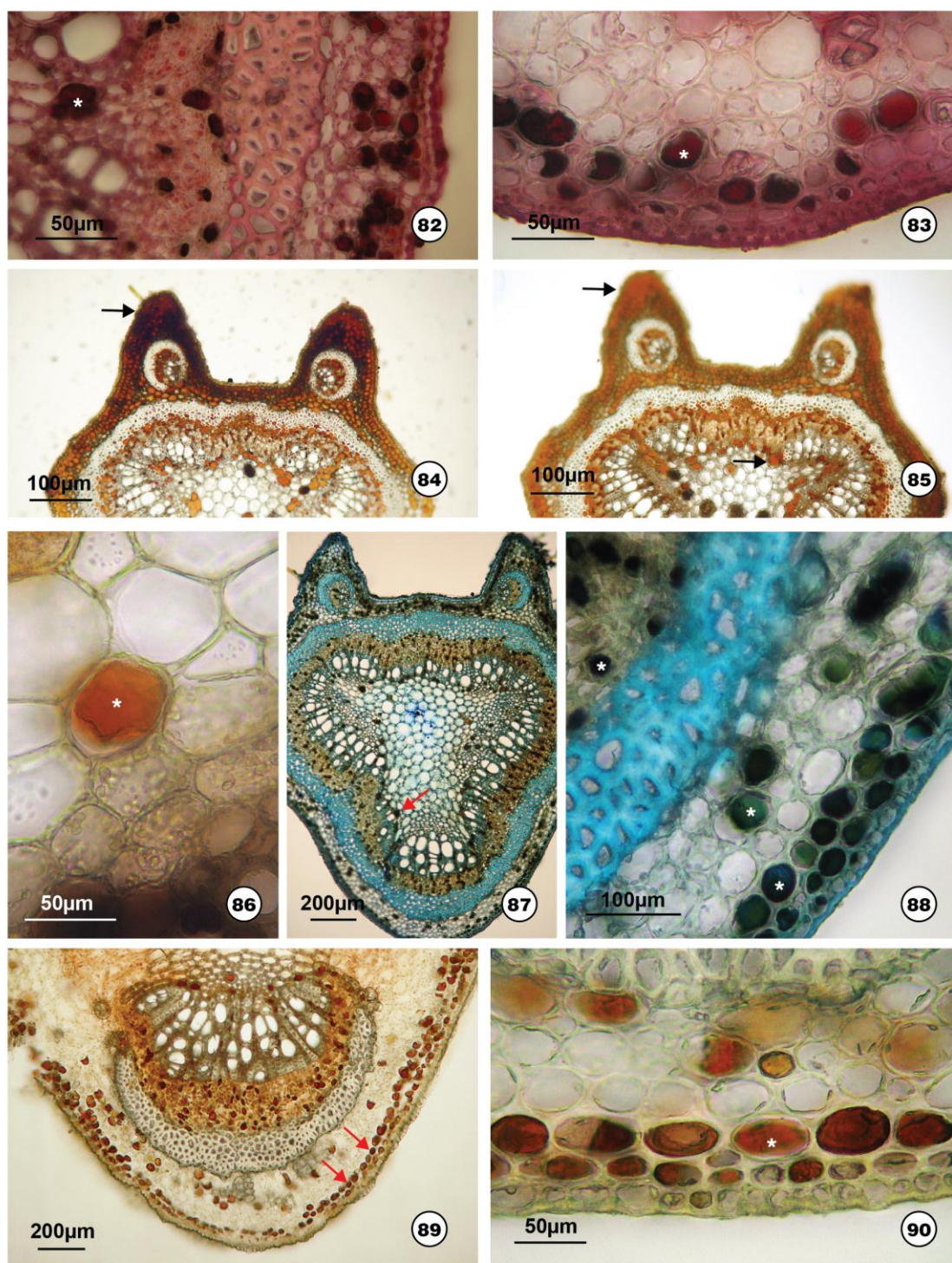
Figuras 63-69. Lâmina foliolar de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Polissacarídeos, lipídios e terpenos. 63-64. Polissacarídeos (asteriscos). 65-66 Lipídios (seta e asteriscos). 67-69. Terpenos (setas e asteriscos). Reagentes. 63-64. PAS/Schiff. 65-66. Azul do Nilo. 67-69. Liebermann-Burchard.



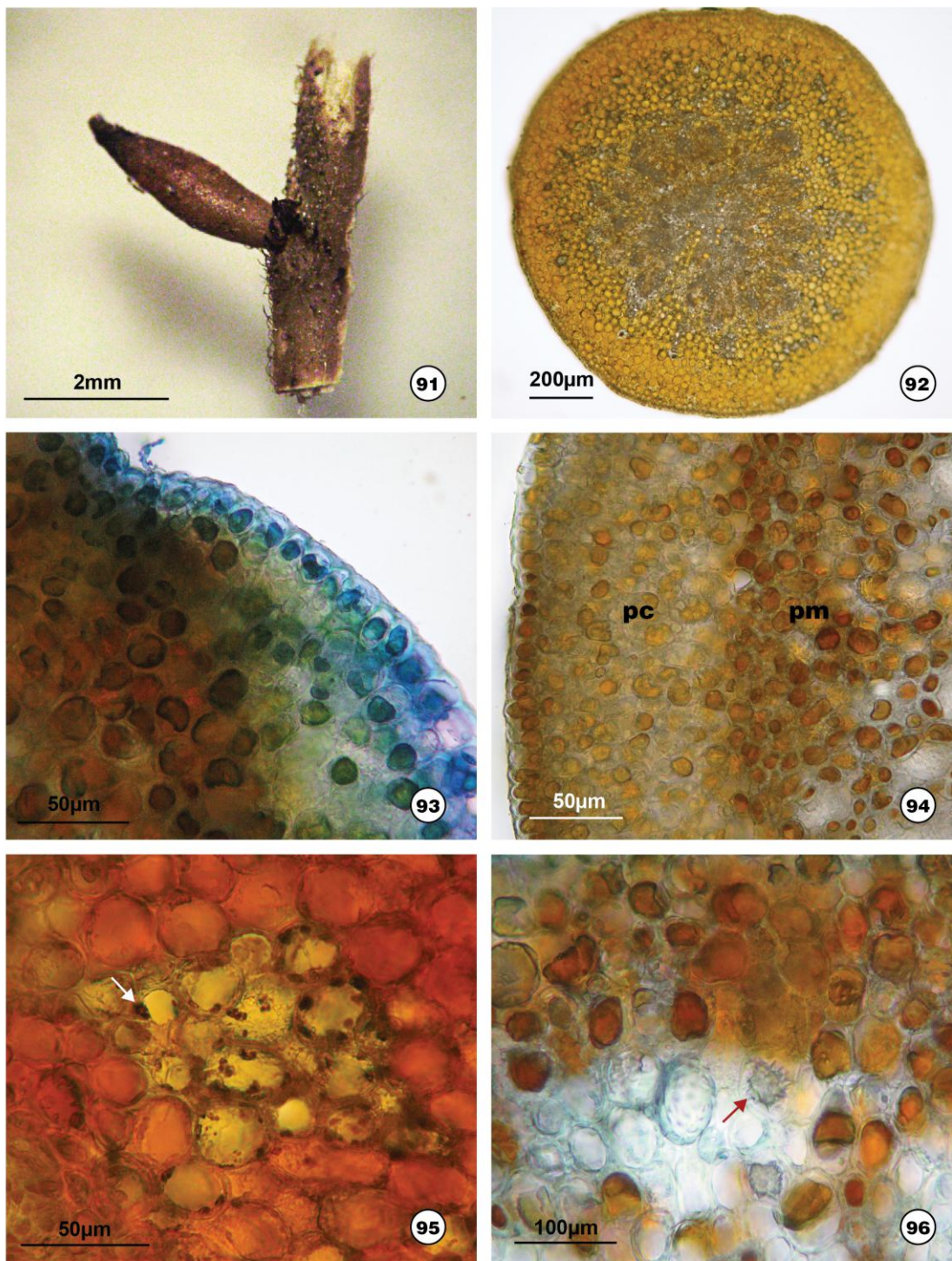
Figuras 70-75. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Aspectos estruturais. 70. Visão geral da ráquis. 71. Visão geral do pecíolo. 72. Grãos de amido no parênquima medular da ráquis (seta). 73. Distribuição dos feixes vasculares no pecíolo. 74. Cristais prismáticos (setas) e idioblastos fenólicos (asterisco) na ráquis. 75. Epiderme papilosa e idioblastos com conteúdos diversos no parênquima cortical do pecíolo. Fixadores. 70-73, 75. FAA. 74. SFF. Coloração. 70, 73, 75. Safranina e azul de Astra. 71-72. Lugol. 74. Ao natural.



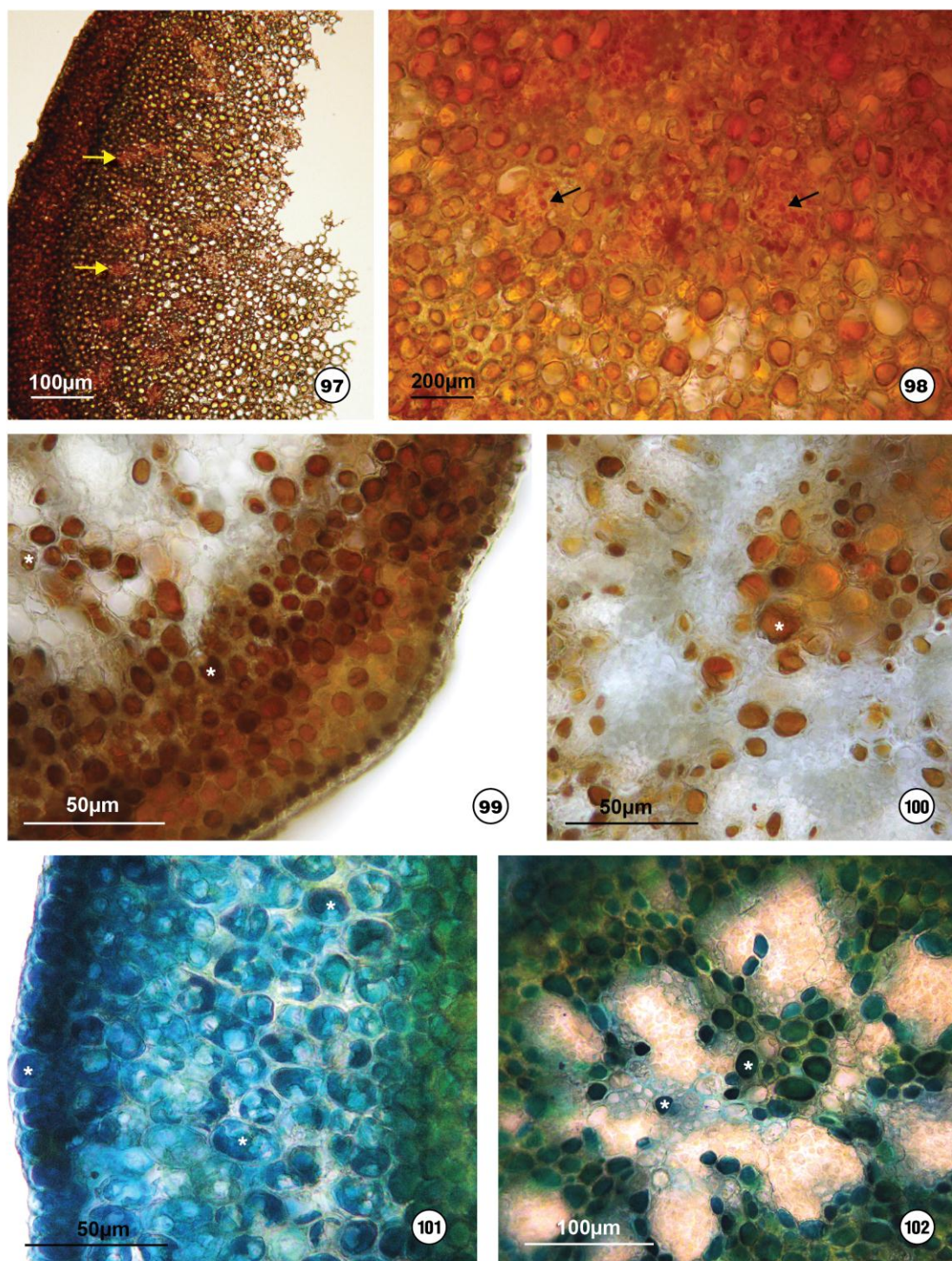
Figuras 76-81. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Alcalóides, compostos fenólicos gerais, cumarinas e flavonóides. 76-77, 80. Raquis. 78-79, 81. Pecíolo. 76-77. Alcalóides (setas). 78. Compostos fenólicos gerais (setas). 79. Cumarinas (seta). 80-81. Flavonóides (setas). Fixadores. 76-77. FNT. 78. SFF. 79-81. Material fresco. Reagentes. 76-77. Iodoplatinato. 80-81. Reagente Natural A.



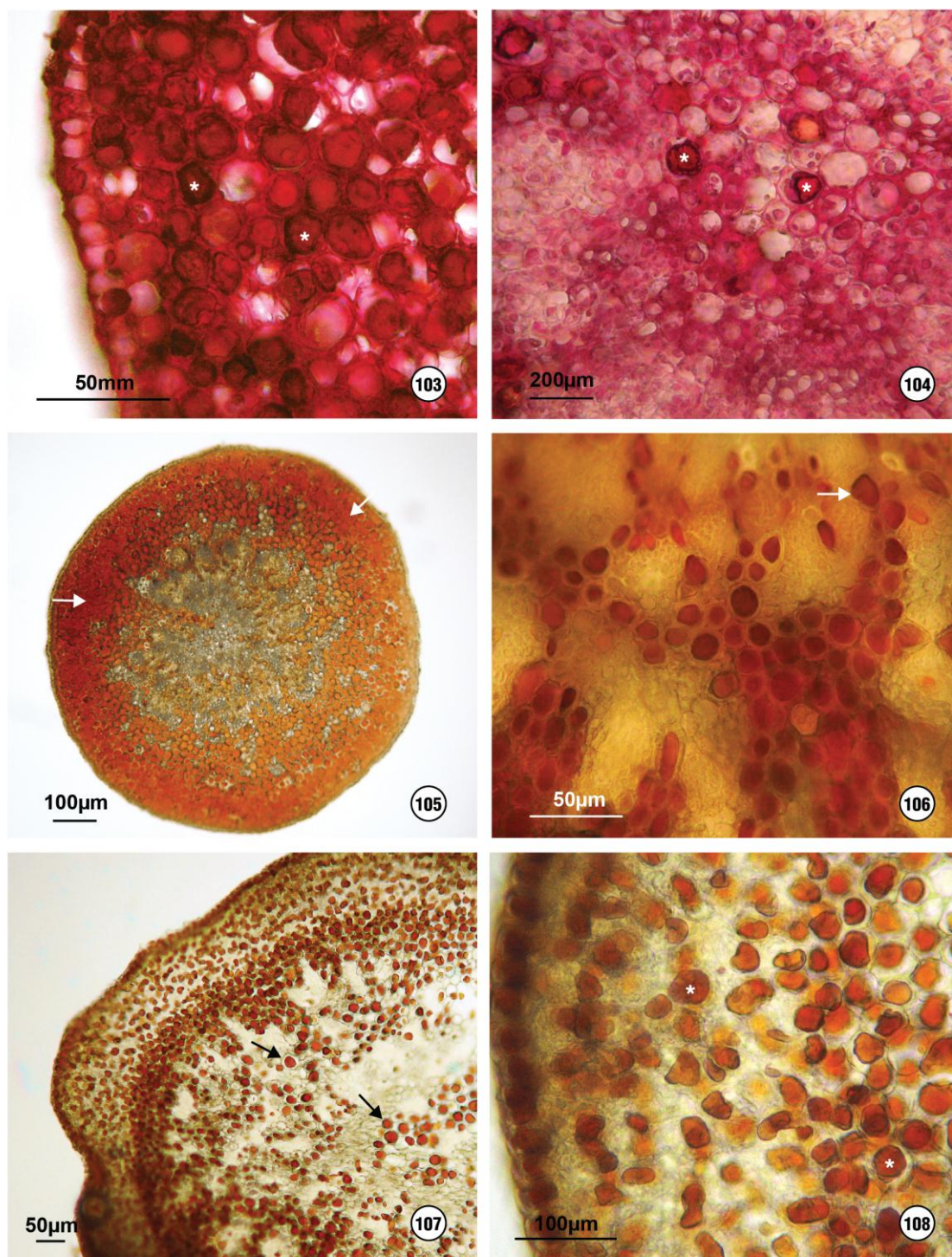
Figuras 82-90. Ráquis e pecíolo de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Polissacarídeos, taninos, lipídios e terpenos. 82, 84-87. Ráquis. 83, 88-90. Pecíolo. 82-83. Polissacarídeos (asteriscos). 84-86. Taninos (setas e asteriscos). 87-88. Lipídios (seta e asteriscos). 89-90. Terpenos (setas e asterisco). Reagentes. 82-83. PAS/Schiff. 84. Acetato de chumbo. 85-86. Vanilina clorídrica. 87-88. Azul do Nilo. 89-90. Liebermann-Burchard.



Figuras 91-96. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. 91. Aspecto da estrutura a olho nu. 92. Aspecto da porção média da estrutura em secção transversal. 93. Detalhe da epiderme. 94. Parênquima cortical (pc) e parênquima medular (pm) da estrutura secretora. 95. Grãos de amido no parênquima medular (seta). 96. Drusas no parênquima cortical (seta). Coloração: 91. Ao natural. 92. Vanilina clorídrica. 93, 96. Azul do Nilo. 94. Cloreto férrico. 95. Lugol.



Figuras 97-102. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. Alcalóides, compostos fenólicos e lipídios. 97-98. Alcalóides (setas). 99-100. Compostos fenólicos (asteriscos). 101-102. Lipídios (asteriscos). Reagentes: 97-98. Iodoplatinato. 99-100. Cloreto férrico III. 101-102. Azul do Nilo.



Figuras 103-108. Estrutura secretora de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*. Secções transversais. Nectário extrafloral de *Senna multijuga*. Polissacarídeos, taninos e terpenos. 103-104. Polissacarídeos (asteriscos). 105-106. Taninos (setas). 107-108. Terpenos (setas e asteriscos). Reagentes: 103-104. PAS/Schiff. 105-106. Vanilina clorídrica. 107-108. Liebermann-Burchard.

5. DISCUSSÃO

Estudos com plantas medicinais são conduzidos atualmente, visando otimizar a obtenção dos resultados, por meio de abordagens diferenciadas para a mesma questão, tais como análises estruturais, fitoquímicas e histoquímicas, para identificar os compostos secundários e seus locais de síntese e/ou armazenamento.

O padrão de venação não foi abordado por Custódio Filho & Mantovani (1986) quando descreveram a morfologia da espécie, tendo sido apenas superficialmente citado para as plântulas estudadas por Amorin *et al.* (2008). Segundo Cardoso & Sajo (2004) e Reis *et al.* (2004), informações sobre padrões de venação consistem em dados importantes sob o ponto de vista taxonômico, podendo se constituir num caráter relevante para a identificação do material foliar em análises de plantas medicinais.

Com respeito à estrutura foliolar, domácias são descritas para a espécie e gênero pela primeira vez, não tendo sido mencionadas por Metcalfe e Chalk (1950) para Caesalpinioideae. Essas estruturas, formadas pela porção basal e revoluta da margem interna dos folíolos, apresentam grande quantidade de tricomas tectores em seu interior, configurando-se num local apropriado para o abrigo e proteção de pequenos animais. Segundo Pemberton & Turner (1989) este é o tipo menos comum de domácias, uma vez que para Wilkinson (1979) costumam ocorrer na axila da nervura central, sob a forma de depressões, bolsas, sacos, ou mesmo tufo de tricomas, exclusivamente na superfície abaxial das folhas.

A relação entre domácias e tricomas ocorrentes na superfície foliar e a presença de ácaros predadores de fungos, além de outros seres fitófagos, está bem documentada em trabalhos de Karban *et al.* (1995), O'Dowd & Pemberton (1998), Matos *et al.* (2004), Rio *et al.* (2005) e Mineiro *et al.* (2006). A mirmecofilia em Leguminosae é reconhecida, sendo que McKey (1989) e Chamberlain & Holland (2009) mencionam a presença de domácias e sua relação com formigas nessa família, mas não fazem referências para o gênero *Senna*. Para Rio *et al.* (2005) e Silva *et al.* (2009) domácias constituem-se num importante caráter taxonômico que deve ser valorizado na descrição botânica das espécies e podem ser uma característica diagnóstica com fins farmacognósticos.

A presença de células com formas diversificadas na epiderme segundo as superfícies adaxial ou abaxial do folíolo corrobora a descrição de Fahn (1974). Rodrigues *et al.* (2009) verificaram para *S. alata*, o mesmo padrão observado neste estudo. Entretanto, Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) observaram que a epiderme se apresenta sinuosa em ambas as faces dos cotilédones e eófilos de *S. multijuga*.

Folíolos com paredes periclinais retas na epiderme da superfície adaxial divergem do observado por Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) para cotilédones e eófilos, nos quais a epiderme mostra-se papilosa em ambas as superfícies. Esta característica parece estar ligada a fatores ambientais, pois Taiz & Zeiger (2004) relacionam a presença de epiderme com células convexas à concentração de raios solares em ambientes sombreados, como o sub-bosque de florestas tropicais, onde se encontram as plantas jovens.

Em folhas expandidas, os estômatos da lâmina foliolar ocorrem apenas na superfície abaxial da epiderme, divergindo das informações de Metcalfe & Chalk (1950) e Rodrigues *et al.* (2009), que reportam lâmina foliolar anfiestomática, respectivamente para *Senna angustifolia* e *S. alata*. Folhas hipoestomáticas costumam ocorrer em Eudicotiledôneas, mas a presença de estômatos em ambas as superfícies foliares pode estar associada a ambientes xéricos (Menezes *et al.* 2003). Mais uma vez observa-se a ocorrência de variação estrutural e temporal, uma vez que Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) relatam cotilédones anfiestomáticos, enquanto os eófilos passam a ser hipoestomáticos.

Embora predomine o arranjo estomático paracítico corroborando informações de Metcalfe & Chalk (1950), também são observados estômatos anisocíticos e anomocíticos em menor quantidade. Em cotilédones e eófilos, Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) observaram unicamente o arranjo anomocítico. Em *S. alata*, Rodrigues *et al.* (2009) observaram predomínio de estômatos paracíticos, ocorrendo também anisocíticos.

Em secção transversal, a posição das células-guarda em nível mais interno que as células subsidiárias está de acordo com Metcalfe & Chalk (1950), para quem a disposição das células subsidiárias é muito variável, mesmo dentro da mesma espécie. Alquini *et al.* (2003) relacionam ao ambiente a posição das células estomáticas em relação à superfície foliar. Neste caso, a disposição dos estômatos em *S. multijuga* subsp. *lindleyana* poderia ser uma adaptação evolutiva a períodos de estresse hídrico.

Embora Watson (1981) mencione a existência de septos delicados em tricomas tectores de Caesalpinioideae, sua presença não foi confirmada para *S. multijuga* subsp. *lindleyana*.

Metcalf & Chalk (1950) atribuem, para o gênero *Senna*, tricomas unicelulares com paredes espessas; entretanto Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) não observaram essas estruturas nos cotilédones e eófilos de *S. multijuga*. Assim, confirmou-se uma maior complexidade estrutural em folhas de indivíduos adultos, em relação às formas juvenis. A esse respeito, para *S. alata*, Rodrigues *et al.* (2009) informam apenas a existência de tricomas unisseriados, não mencionando o número de células. Caso a presença dos tricomas tectores multicelulares seja confirmada como exclusiva em *Senna multijuga* subsp. *lindleyana*, tal aspecto pode ser incluído nas características diferenciais para sua identificação.

A distribuição desigual de tricomas tectores sobre a lâmina foliolar, ocorrendo preferencialmente na superfície abaxial, próximo à nervura central e no interior da margem revoluta foi igualmente descrita em *S. alata* por Rodrigues *et al.* (2009), embora os autores não tenham verificado a existência de domácias nessa espécie.

Dentre as funções desempenhadas pelos tricomas tectores, Beal (1878) já mencionava a proteção contra predadores e raios solares; Levin (1973) os relacionou à proteção contra a oviposição de insetos fitófagos; e Wagner *et al.* (2004) ratificaram essas informações, atribuindo outras importantes funções fisiológicas e ecológicas a esses anexos epidérmicos, tais como manutenção do equilíbrio hídrico da lâmina foliar, dispersão de diásporos, proteção contra a ação abrasiva do vento e choques mecânicos, proteção de gemas, redução da movimentação de insetos sobre a folha e redução do nível fotossintético.

Tricomas glandulares distribuem-se de forma esparsa na lâmina foliolar, especialmente próximos à nervura central e na domácia. São capitados, de acordo com a nomenclatura proposta por Fahn (1988). Interessante notar que Rodrigues *et al.* (2009) também verificaram a raridade espacial dos tricomas glandulares de *S. alata*, e sua ocorrência relacionada à nervura central, sendo eles de dois tipos: esféricos e claviformes. Para conhecer seu papel em *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, sugere-se a condução de testes histoquímicos, buscando identificar a composição de seu conteúdo.

De modo geral, os tricomas tectores e glandulares são classificados de acordo com sua composição celular, indumento e conteúdo, constituindo-se, segundo

Theobald *et al.* (1979) e Behnke (1984), numa importante característica taxonômica. Tricomas tectores unisseriados multicelulares e tricomas glandulares capitados, neste caso, podem ser considerados como características significativas para o reconhecimento da espécie.

A lâmina foliolar apresenta arranjo dorsiventral, corroborando observações de Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) para cotilédones e eófilos e de Rodrigues *et al.* (2009) para *S. alata*; entretanto Metcalfe & Chalk (1950) afirmam que, em *S. angustifolia*, a lâmina foliolar é isobilateral. Esta é uma característica mais adaptada às condições de baixa disponibilidade hídrica, considerada xeromórfica, uma vez que em espécies de Eudicotiledôneas mesofíticas se observa lâmina foliolar geralmente dorsiventral (Menezes *et al.* 2003).

Grãos de amido são raros no limbo foliolar, ocorrendo ocasionalmente na base dos folíolos na forma de uma bainha amilífera ao redor da nervura central. São encontrados nas células subsidiárias dos estômatos, as quais também se caracterizam pela ausência de substâncias ergásticas – ao contrário das demais células epidérmicas (Wilkinson 1979).

Grande quantidade de idioblastos secretores é encontrada em todos os tecidos da lâmina foliolar, concordando com informações de Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) e Metcalfe & Chalk (1950); para estes, existem consideráveis dúvidas acerca da natureza química dos conteúdos dessas células, o que estimula sua investigação. Não foram verificadas cavidades secretoras. As estruturas secretoras foram observadas de forma isolada, constituindo os idioblastos, ou em organizações multicelulares como epiderme e tricomas, dentre outras, corroborando informações de Castro & Demarco (2008).

Drusas e cristais prismáticos foram observados no folíolo expandido, formando grupos, principalmente na região da nervura central e próximo aos feixes vasculares menores, mantendo características observadas por Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) nos cotilédones. Cristais agrupados constituem uma característica diferencial entre Caesalpiniodeae e as demais subfamílias de Leguminosae (Metcalfe & Chalk 1950, Dickison 1981), configurando-se numa característica taxonômica do grupo. Para a planta, cristais podem atuar na regulação do balanço iônico, imobilização do oxalato e fornecer suporte estrutural (Franceschi & Nakata 2005, Navarro *et al.* 2007), além de atuarem como deterrentes para insetos fitófagos (Santos *et al.* 2008).

Na ráquis e no pecíolo da planta adulta verifica-se essencialmente as mesmas características externas observadas por Amorim *et al.* (2008) em plântulas da espécie. Do mesmo modo que na lâmina foliolar, a forma das células epidérmicas da ráquis e do pecíolo varia de achatada à papilosa. Drusas agrupam-se próximo aos feixes vasculares, o que está relacionado ao suporte mecânico dessas estruturas (Navarro *et al.* 2007). No pecíolo, são verificadas três a quatro camadas de células de colênquima angular, cuja função básica é sua sustentação.

Na ráquis das folhas expandidas foram observadas estruturas secretoras sempre entre o par de folíolos basais, algumas vezes entre o par de folíolos apicais e raramente entre os demais pares de folíolos. Custódio Filho & Mantovani (1986) apontam a existência dessas glândulas apenas entre os folíolos basais, enquanto Amorim *et al.* (2008) afirmam que ocorrem entre todos os pares de folíolos. Sugere-se a condução de estudos para conhecer a razão desta distribuição desigual das estruturas secretoras ao longo da ráquis foliar.

Macromorfológicamente, Custódio Filho & Mantovani (1986) classificam as estruturas secretoras como glândulas estipitadas, referindo-se ao seu formato cilíndrico. Segundo Amorin *et al.* (2008), estas glândulas são cônicas e com aspecto estipuliforme. Entretanto, embora cônicas, estas estruturas não se parecem com as estípulas observadas na espécie e, considerando sua localização sobre a ráquis foliar, entende-se que o termo “glândula estipitada” é mais apropriado.

Diferentemente do observado por Paiva & Machado (2006) para *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Leguminosae), as estruturas secretoras de *S. multijuga* subsp. *lindleyana* projetam-se para cima e para fora dos tecidos foliares e o secretado parece ser eliminado por um poro apical.

Os testes histoquímicos realizados buscaram conhecer a localização dos compostos secundários identificados por meio da análise fitoquímica preliminar.

Alcalóides foram evidenciados unicamente nos tecidos relacionados ao floema do mesófilo foliolar, ráquis, pecíolo e nectário extrafloral. De acordo com Ziegler e Facchini (2008), embora geralmente sejam armazenados em células específicas, devido à sua toxicidade e provável papel exercido na defesa das plantas, essas substâncias podem ser produzidas nas células condutoras do floema.

Cabe lembrar que o local de síntese de alcalóides foi primeiramente elucidado em *Nicotiana* L. (Solanaceae), ocorrendo nas raízes, de onde são posteriormente distribuídos para as demais partes da planta (Waller & Nowacki 1978,

Ziegler & Facchini 2008). Bird *et al.* (2003) verificaram que os alcalóides da papoula (Papaveraceae) são sintetizados nas células companheiras e translocados para os elementos de tubo crivado, acumulando-se nos laticíferos. A ricinina parece ser sintetizada em todas as partes de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), especialmente naquelas de crescimento mais ativo (Waller & Nowacki 1978). Estudos realizados com *Lupinus exaltatus* (Leguminosae) apontam as folhas como locais de síntese dos alcalóides e os frutos e sementes como os órgãos de armazenamento (Zamora-Natera *et al.* 2009).

Assim, é possível que cada família botânica apresente suas peculiaridades em relação aos sítios de síntese e armazenamento dos alcalóides. Os resultados observados em *S. multijuga* subsp. *lindleyana* corroboram as informações obtidas até o momento para Leguminosae (Waller & Nowacki 1978, Ziegler & Facchini 2008, Zamora-Natera *et al.* 2009).

Compostos fenólicos foram encontrados preferencialmente nos tecidos parenquimáticos da folha de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, confirmando observações de Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) para o mesófilo eofilar. Para Fahn (1988), idioblastos fenólicos são de ocorrência generalizada em Leguminosae.

Uma vez que esses compostos envolvem uma gama de substâncias, dentre as quais sobressaem cumarinas, flavonóides, ligninas, quinonas e taninos, entre outros (Vermerris & Nicholson 2006, Castro & Demarco 2008), justifica-se sua ampla distribuição entre as plantas. A esses compostos são atribuídas diversificadas funções, tais como proteção contra herbivoria, atração de polinizadores e interações alelopáticas (Lambers *et al.* 1998, Hartmann 2007).

Substâncias compatíveis com flavonóides foram observadas nos tricomas tectores, confirmando informações de Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro (2005) obtidas para *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae) e suas funções podem estar relacionadas à proteção contra os raios ultravioleta do sol e contra insetos, fungos, vírus e bactérias (Tattini *et al.* 2000, Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro 2005, Gould & Lister 2006, Zuanazzi & Montanha 2007).

Flavonóides foram identificados também em regiões da ráquis e do pecíolo que haviam sofrido dano, de modo que é possível inferir que tenham alguma ação cicatrizante ou antimicrobiana, o que corrobora informações de Bruneton (1995). Segundo o autor, um grande número de isoflavonóides consiste em fitoalexinas, substâncias produzidas em resposta ao ataque de algum organismo patogênico,

geralmente um fungo. Entretanto, sugere-se a continuidade das investigações para verificar a validade dessa hipótese no caso de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*.

No parênquima paliçádico igualmente foram observados flavonóides, concordando com Bruneton (1995), para quem esses compostos podem ocorrer nas epidermes e no mesofilo foliar. Flavonóides estão amplamente distribuídos no organismo vegetal e podem ocorrer em diferentes fases de seu ciclo vital (Fico *et al.* 1999). Esta informação estimula o seguimento das pesquisas visando conhecer os demais sítios de produção e/ou armazenamento dessas substâncias, assim como as fenofases em que ocorrem.

Compostos fenólicos foram localizados no parênquima foliar, próximo à epiderme e, especialmente, na estrutura secretora. Talvez se tratem de taninos, uma vez que a análise fitoquímica preliminar detectou essa substância na folha. Taninos atuam como dissuasivos alimentares (Lambers *et al.* 1998, Haslam 2007, Santos e Mello 2007), precipitando proteínas e dificultando a digestão dos predadores, os quais diminuem o forrageamento na espécie que os produz. Fahn (2000) relata uma série de substâncias que podem fazer parte do néctar, mas não menciona taninos. A presença de baixas concentrações dessas substâncias foi relatada por Ciccarelli *et al.* (2001) nas estruturas secretoras de *Hypericum perforatum* L.. Talvez os taninos evitem o ataque à estrutura secretora, direcionando os animais coletores de néctar ao poro que libera a secreção, o que estaria de acordo com Pemberton (1998).

A grande quantidade de idioblastos registrados como contendo compostos fenólicos, contribui para confirmar sua ampla distribuição em Leguminosae, bem documentada por Fahn (1988).

Nas células da epiderme, na superfície adaxial do folíolo, observou-se conteúdo lipídico, bem como idioblastos contendo polissacarídeos, dispersos aleatoriamente. Com relação aos idioblastos com conteúdo lipídico, cabe salientar que podem se constituir em uma forma de defesa contra insetos fitófagos, conforme destacado por Viegas Junior (2003), ao passo que os idioblastos contendo polissacarídeos merecem maiores investigações.

No parênquima da folha de *S. multijuga* subsp. *lindleyana* há uma grande quantidade de idioblastos com conteúdo lipídico, cuja coloração natural interferiu na interpretação dos resultados obtidos para alguns testes. Talvez essa coloração seja causada pela presença de carotenóides, pigmentos amarelados amplamente distribuídos

entre as plantas, cujas funções relacionam-se à fotossíntese e proteção contra raios ultravioleta, como informa Ikan (1991).

Os polissacarídeos observados no mesófilo foliolar estão relacionados aos processos fotossintéticos, fato bem reportado em literatura (Taiz & Zeiger 2004). Esses compostos foram também encontrados nos tecidos da ráquis e do pecíolo, e de acordo com Haslam (2007), podem ser encontrados em todos os órgãos da planta.

Análises cromatográficas realizadas para a espécie (Silva e Young, dados não publicados) demonstraram ser a folha o órgão com maior concentração de compostos com atividade biológica. Dessa forma, os estudos fitoquímicos conduzidos neste trabalho buscaram corroborar a presença de alcalóides e flavonóides e fornecer uma melhor definição de quais compostos poderiam ser os responsáveis pelas respostas obtidas nos testes histoquímicos realizados nas folhas de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*.

Na análise fitoquímica preliminar, todos os testes para alcalóides corroboraram a presença destas substâncias. Os testes para flavonóides confirmaram a presença de flavonas reportadas por Serrano (2009), mas também indicaram haver flavonóis na planta.

Embora a caracterização dos principais grupos de compostos secundários de interesse tenha sido efetuada pela realização de reações químicas de coloração ou precipitação preconizadas pela fitoquímica tradicional, a interpretação dos resultados deve ser cuidadosa, pois algumas reações são inespecíficas, podendo resultar em falsos positivos, como alertado por Bruneton (1995) e Falkenberg *et al.* (2007). Por esta razão, nos testes preliminares é prudente mencionar a “provável” presença dos compostos pesquisados.

Talvez os resultados para cumarinas tenham se mostrado inconclusivos devido à sua provável baixa concentração na planta, pois, de acordo com Costa (2000), por meio dos ensaios realizados, deveria ser possível observar fluorescência dessas substâncias, quando submetidas à luz UV com comprimento de onda de 366 nm.

Espécies de *Senna* são reportadas em literatura como portadoras de antraquinonas, as quais são conhecidas por suas propriedades laxativas, constituindo um caráter quimiotaxonômico para o gênero (Viegas Junior *et al.* 2006, Falkenberg 2007, Lombardo *et al.* 2009, Rodrigues *et al.* 2009). Em *S. multijuga*, Singh (1981), verificou a existência de antraquinonas nas sementes. A ausência dessas substâncias nas folhas observada neste trabalho é uma característica interessante, uma vez que em espécies tradicionalmente empregadas como medicinais (*Senna angustifolia* (Vahl) Batka e *S.*

corymbosa (Lam.) HS Irwin & Barneby) o farmacógeno é constituído pelas folhas (Metcalf & Chalk 1950, Barba *et al.* 1992).

No decorrer do trabalho surgiram algumas dificuldades procedimentais, a seguir relatadas:

Tricomas glandulares foram observados uma única vez em material fixado e emblocado em paraplast e raramente vistos em material fresco, sugerindo sua efemeridade na planta. Embora a metodologia de preparação do material para análises estruturais esteja bem estabelecida (Brito & Alquini 1996, Kraus & Arduin 1997), não houve a adequada preservação dos tricomas tectores. Talvez estas estruturas tenham se desprendido da folha durante as etapas de fixação e armazenamento, ou mesmo não tenham sido observadas nas secções de 12 µm de espessura, produzidas ao micrótomo, uma vez que apenas fragmentos basais desses tricomas foram registrados. Assim, utilizaram-se materiais frescos e/ou fixados, cujas lâminas foram preparadas a partir de amostras seccionadas manualmente.

No caso dos alcalóides, o material fixado submetido às desidratações etanólica (Kraus & Arduin 1997) e butanólica (Johansen 1940), emblocado e montado em lâminas permanentes, produziu resultados negativos. Testes realizados com os reagentes de Ellram, Dragendorff e Wagner não evidenciaram essas substâncias, mas apenas aquelas que haviam sido identificadas por meio do fixador SFF como sendo compostos fenólicos gerais.

Fazendo uso dos mesmos reagentes, porém com material fresco, ou apenas fixado em FNT e seccionado à mão livre, houve forte sobreposição da coloração obtida com a cor naturalmente amarelada dos conteúdos de células secretoras abundantemente distribuídas nos tecidos foliolares. De acordo com Costa (2000), esta coloração pode ser devido aos carotenos, substâncias lipídicas comumente encontradas nas folhas das plantas.

Diante do exposto, optou-se por utilizar o reagente iodocloroplatinato, empregado por Wagner & Bladt (2001) e Serrano (2006) em análises cromatográficas, pois a reação produz tons de violeta, destacando-se nos tecidos pesquisados.

Uma vez que os testes para alcalóides em lâminas permanentes não apresentaram resultados satisfatórios, mesmo fazendo uso de iodocloroplatinato, e partindo das afirmações de Feder & O'Brien (1968) e Henriques *et al.* (2007), infere-se que distorções provocadas pelos processos de fixação, desidratação e emblocamento podem ter interferido na composição química das células, produzindo alterações

importantes a ponto de não serem observados os compostos evidenciados pela análise fitoquímica.

Com base nessas informações, optou-se por manter o material fixado em FNT, sem submetê-lo ao armazenamento em etanol 70%, realizando controle periódico do pH da solução. A partir desse material, os testes realizados para histolocalizar alcalóides mostraram-se adequados.

Lipídios, polissacarídeos e terpenos foram igualmente pesquisados a partir de material fixado em FNT, mas não estocado em etanol 70%, fornecendo resultados mais visíveis.

Seguindo metodologias propostas por Schnitzer *et al.* (1996) e Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro (2005), a pesquisa de flavonóides foi realizada com amostras frescas, mas também optou-se por utilizar material fixado em FNT. Para a investigação de taninos, o material que apresentou reações mais nítidas foi o fixado em FAA. Em nenhum caso foram utilizadas amostras estocadas em etanol 70%.

O material fresco testado para flavonóides apresentou resposta positiva para os reagentes Natural A e cloreto de alumínio. Material fixado em FNT e testado com o reagente Natural A igualmente apresentou resposta positiva, embora um pouco mais fraca do que os testes com material fresco. Talvez tenha-se observado positividade para flavonóides no material fixado devido ao pH neutro da solução estoque, fato reportado por Sant'Ana Filho *et al.* (2005).

Para a pesquisa de taninos foram utilizados vanilina clorídrica, cuja resposta positiva seria a formação de coloração entre alaranjado e vermelho ou marrom (Mace & Howell 1974), bem como o acetato de chumbo, que deveria produzir um precipitado esbranquiçado (Costa 2000). Os resultados obtidos para a vanilina clorídrica conferem com a literatura, mas a reação com acetato de chumbo resultou em coloração que variou do alaranjado ao marrom, nos mesmos tecidos que responderam à vanilina. De acordo com Costa (2000), o acetato de chumbo não é específico para taninos, reagindo também para outros compostos fenólicos, o que talvez explicaria essa resposta diferenciada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Senna multijuga subsp. *lindleyana*, importante espécie da Mata Atlântica e de ampla ocorrência no território nacional, tem sido objeto de estudos bioquímicos, mostrando-se promissora para fins farmacológicos, por apresentar compostos bioativos com ação antiacetilcolinesterásica e antifúngica.

As características estruturais foliares de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, para a qual, até o momento, havia poucas informações, estão melhor estabelecidas. A presença de caracteres como epiderme papilosa, estômatos paracíticos e cristais organizados em grupos foi confirmada. Identificou-se o padrão de venação e a presença de domácias na espécie e verificou-se que as estruturas secretoras ocorrem de forma aleatória sobre a ráquis foliar.

Aspectos relacionados à diversidade de formas celulares da epiderme nas superfícies adaxial e abaxial das folhas em uma mesma espécie, como observado em *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, estão bem fundamentados na literatura, assim como a variação nos tipos estomáticos e a presença de cristais de oxalato de cálcio.

Eventos temporais observados em cotilédones, eófilos e folhas expandidas, como forma e posição dos estômatos, presença e diversidade de tricomas, quantidade de cristais e distribuição das estruturas secretoras, estão associados ao aumento da complexidade estrutural nas etapas de desenvolvimento da espécie.

Pela primeira vez verificou-se a presença de domácias, na porção abaxial e basal dos folíolos, que podem abrigar pequenos animais. Embora domácias sejam estruturas relativamente freqüentes entre as Eudicotiledôneas, até o momento não haviam sido mencionadas para Caesalpiniodae. Essa característica pode vir a se constituir em um importante diferencial taxonômico para *S. multijuga* subsp. *lindleyana*.

As estruturas secretoras da ráquis carecem de maiores estudos, pois a composição do secretado não foi totalmente elucidada e, embora tenha se verificado diversas substâncias em suas células, inclusive polissacarídeos, não foi possível observar a presença de açúcares simples, o que permitiria denominar tais estruturas de nectários extraflorais; além disso, seria interessante compreender o papel desempenhado pelos taninos nessas estruturas. Assim, estudos histoquímicos específicos são indispensáveis para que se conheça a composição da secreção produzida pela glândula nesta espécie e, conseqüentemente, sua relação com mecanismos de defesa e/ou de mutualismo.

Considerando a proximidade espacial entre glândulas raqueais e domácias, seria interessante estabelecer as relações entre estas estruturas e animais, em função do papel ecológico desempenhado por *S. multijuga* subsp. *lindleyana* em seu ambiente natural e na recuperação de áreas degradadas.

Tricomas tectores multicelulares não haviam, também, sido reportados para a espécie. Trabalhos anteriores informavam a presença de tricomas unicelulares, os quais não foram observados neste estudo. Tricomas glandulares igualmente não haviam sido descritos para *S. multijuga* subsp. *lindleyana*. Devido à sua efemeridade, não foi possível averiguá-los adequadamente, sendo que sua composição química demanda maiores investigações.

Sob os aspectos farmacognóstico e taxonômico, informações relacionadas ao padrão de venação, à presença de margem revoluta e estrutura secretora raqueal, bem como às características observadas para os tricomas, constituem-se em importantes dados diferenciais entre *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* e as demais espécies do gênero, uma vez que essa vem sendo pesquisada em função de seus compostos bioativos.

Entretanto, sugere-se a continuidade das investigações com essa planta, principalmente relacionadas à ontogenia foliolar, pois ainda existem incertezas quanto à classificação dos tricomas glandulares. Recomenda-se também a realização de análises com microscópio eletrônico de varredura, para esclarecer especialmente a organização estrutural desses tricomas, além de novas análises histoquímicas.

A abordagem multidisciplinar de qualquer tema constitui-se numa prática enriquecedora cujos resultados sempre formam um arcabouço teórico consistente.

Quando se trata de investigar os compostos secundários, a fitoquímica e a histoquímica fornecem uma diversidade de métodos que são empregados no início do processo de bioprospecção. Estudos sobre a bioatividade dos metabólitos de plantas proporcionam informações mais precisas sobre as possíveis utilizações terapêuticas das substâncias investigadas.

A análise fitoquímica preliminar realizada com as folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* contribuiu para direcionar a busca dos compostos secundários, uma vez que foram pesquisados apenas aqueles evidenciados por tal análise.

Com o auxílio dos métodos fitoquímicos, foi possível verificar a existência de heterosídeos cardioativos, saponinas e taninos e corroborar a presença de alcalóides e flavonóides.

Os testes histoquímicos permitiram conhecer a localização de compostos fenólicos e alcalóides nos tecidos foliolares.

Alcalóides foram encontrados exclusivamente no floema, corroborando informações de que, em Leguminosae, são produzidos nas folhas.

Embora os flavonóides também tenham sido observados no mesófilo foliolar, sua presença em ambas as superfícies da epiderme está igualmente de acordo com a literatura, porquanto se relacionam à proteção da planta contra os raios UV, bem como contra diversos tipos de microorganismos.

A observação de grandes quantidades de idioblastos com compostos fenólicos pode estar associada à presença de taninos que, para a planta, atuam especialmente como dissuasivos alimentares.

Testes mais específicos devem ser conduzidos, uma vez que a análise fitoquímica preliminar indicou em folhas de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, a existência de heterosídeos cardioativos que são formados por um anel lactônico, um núcleo esteroidal e resíduos de açúcar. Talvez essas substâncias tenham sido identificadas separadamente na análise histoquímica como compostos fenólicos gerais, terpenos e polissacarídeos (que podem ser moléculas formadoras de heterosídeos), constituindo idioblastos de secreção mista.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, houve a necessidade de experimentar e adequar técnicas, pois alguns testes padronizados não se mostraram eficazes, como no caso dos tricomas de *S. multijuga* subsp. *lindleyana*, cuja estrutura não pode ser adequadamente observada em material emblocado em paraplast.

Da mesma forma, determinados testes histoquímicos não forneceram os melhores resultados quando em amostras emblocadas em paraplast, como os testes para alcalóides. No caso destas substâncias verificou-se também que o material fixado e conservado em FNT foi mais apropriado do que aquele armazenado em etanol.

Entretanto, o material emblocado em paraplast prestou-se para histolocalizar determinados tipos de compostos secundários, como os compostos fenólicos gerais, lipídios e óleos, moléculas grandes com alto peso molecular.

No caso da pesquisa de taninos, observou-se uma resposta distinta da esperada para o reagente acetato de chumbo, de modo que se fazem necessários ajustes na metodologia.

Por conta dos pigmentos naturais encontrados nas plantas, os quais foram observados no material denominado “branco”, o uso de reagentes como Dragendorff,

Ellram e Wagner, tradicionalmente empregados em testes histoquímicos se mostraram inadequados, pois os resultados obtidos podem ter sido evidenciados por esses pigmentos resultando em falsos positivos.

Talvez devido ao caráter neutro da solução, o fixador à base de formalina neutra tamponada não só se mostrou apropriado para alcalóides como, também, para outros compostos. Deste modo, a manutenção do material nesse fixador, sem submeter à estocagem em etanol, pode se constituir numa possível alternativa metodológica para pesquisas em histoquímica. Entretanto, salienta-se a importância do controle de pH da solução, bem como a rápida utilização das amostras fixadas, para evitar a ocorrência de reações químicas entre as amostras e o fixador, que possam comprometer a obtenção dos resultados.

Os resultados deste trabalho apontam para novos direcionamentos da pesquisa com plantas, associando apropriadamente os métodos histoquímicos aos fitoquímicos, pois abordagens multidisciplinares se fazem necessárias para superar alguns obstáculos metodológicos e obter informações mais precisas nessa área.

7. RESUMO – (Análise estrutural de folhas de *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) e localização *in situ* de compostos com ação biológica de interesse farmacológico). *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby – Leguminosae é objeto de estudos de bioprospecção farmacológica, mas faltam informações estruturais, histoquímicas e fitoquímicas. Estudos anteriores indicaram ser a folha o órgão com maior quantidade de compostos bioativos, justificando sua escolha para a realização deste trabalho. Foram confirmadas características estruturais já descritas: epiderme uniestratificada, mesofilo hipoestomático, presença de cristais e grande quantidade de idioblastos secretores. Além disso, foram observados pela primeira vez, o padrão de venação, a existência de domácias caracterizadas pela margem revoluta na base dos folíolos, próximo ao nectário extrafloral, a presença de tricomas tectores multicelulares e de tricomas glandulares capitados, além de nova descrição para o padrão estomático. Testes histoquímicos indicaram a presença de alcalóides exclusivamente no tecido floemático, compostos fenólicos gerais nos diversos parênquimas da folha, flavonóides nos tricomas tectores, epiderme e parênquima clorofiliano, cumarinas no mesofilo foliolar, lipídios ácidos na epiderme e parênquima lacunoso, polissacarídeos em células parenquimáticas, taninos em idioblastos secretores, e terpenos na epiderme e em células parenquimáticas, todos observados em folíolos, raquis, nectário extrafloral e pecíolo. Há evidências de que, à exceção dos alcalóides, as demais substâncias ocorrem geralmente em idioblastos de secreção mista. A análise fitoquímica preliminar das folhas corroborou a presença de alcalóides e flavonóides e evidenciou cumarinas, heterosídeos cardioativos, saponinas e taninos. Com relação aos métodos utilizados, amostras armazenadas em etanol 70% sofreram extração de compostos secundários, não sendo adequadas aos testes. A fixação em formalina neutra tamponada (FNT) seguida de corte à mão livre e da reação com iodoplatinato forneceu os melhores resultados para alcalóides, enquanto os materiais emblocados em Paraplast para confeccionar lâminas permanentes não se mostraram adequados para histolocalizar essas substâncias. Flavonóides foram observados em material fresco e em material fixado em FNT. Diferentes testes para taninos apresentaram resultados semelhantes, contrariando dados de literatura. As informações obtidas neste trabalho estimulam a realização de pesquisas multidisciplinares, necessárias para superar alguns obstáculos metodológicos e obter resultados mais completos no âmbito da bioprospecção de plantas com interesse farmacológico.

Palavras-chave: *Senna multijuga*, anatomia, histoquímica, fitoquímica.

8. ABSTRACT – (Structural analysis from *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) leaves and *in situ* localization of biological active compounds with pharmacological interest). *Senna multijuga* subsp. *lindleyana* (Gardner) H.S. Irwin & Barneby – Leguminosae is a subject of many studies about pharmacological screening, but structural, histochemical and phytochemicals information still need special attention. From the analyzed organs, the leaf has been pointed as the one that presented higher quantities of bioactive compounds, and that's why it was chosen for this present work. It was possible to confirm structural characteristics already described: unistratified epiderm, hypostomatic mesophyll, crystals presence and high quantities of secretory idioblasts. Therefore, the leaflet analyses allow us to know, for the first time, standard of venation, the existence of domatia characterized by the revolute edge at the base of the leaflet, next to the areolar secretory structure and multicellular hairs and capitated glandular hairs presence, besides stomatal pattern. Alkaloids were observed only in phloem, phenolic compounds in all leaf's parenchymas, flavonoids in non-glandular trichomes, epiderm and leaflet mesophyll, coumarins in leaflet mesophyll, acid lipids in epiderm and spongy mesophyll, polysaccharides in parenchymal tissues, tannins in idioblasts in many leaflet parenchymas, and terpenes in epiderm and parenchymas; all of these compounds were observed in leaflet, rachis, extrafloral nectaries and petiole. There are evidences that, with the exception of the alkaloids, the other substances occur usually in idioblast's mixed secretion. Leaves phytochemical preliminary analysis has proven the presence of alkaloids and flavonoids and offered evidences of coumarins, cardiac glycosides, saponins and tannins. About the methodology used in this work, stored samples in 70% ethylic alcohol were affected by extraction of secondary compounds during the storage, not being appropriate to tests. The fixative in buffered neutral formalin (FNT) and the reactions with iodineplatinite provide the best results for alkaloids. It was observed that permanent plates were unsuitable for alkaloid histolocalization. Flavonoids were observed in fresh material and could be detected in FNT fixative. Different tests for tannins were realized and presented similar results, opposing literature data. The results instigate the search for simpler and preciser microtechnique procedures than those usually used. The data obtained in this work stimulate multidisciplinary research, that's necessary to overcome some methodological obstacles and get better results in the scope of pharmacological screening in plants.

Key-words: *Senna multijuga* , anatomy, histochemistry, phytochemistry

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, D.B., Meira, R.M.S.A. & Ferreira, F.A.** 2004. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). *Planta Daninha* 22: 483-489.
- Albuquerque, E.S.B. & Neves, L.J.** 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). *Acta Botanica Brasilica* 18: 99-108.
- Alquini, Y., Bona, C., Boeger, M.R.T., Costa, C.G. & Barros, C.F.** 2003. Epiderme. *In: Appezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (ed.). Anatomia vegetal.* EdUFV, Viçosa, pp. 87-107.
- Amorim, I.L., Davide, A.C., Ferreira, R.A. & Chaves, M.M.F.** 2008. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby – Leguminosae Caesalpinioideae. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 507-516.
- Antai-Otong, D.** 2003. The art of prescribing – acetylcholinesterase inhibitors in dementia. *Perspectives in Psychiatric Care* 39: 83-85.
- APG I.** 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531–553.
- APG II.** 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399–436.
- APG III.** 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- Areche, C., Cejas, P., Thomas, P., San-Martín, A., Astudillo, L. Gutiérrez, M. & Loyola, L.A.** 2009. Triterpenoids from *Azorella trifurcata* (Gaertn.) Pers and their effects against the enzyme acetylcholinesterase. *Química Nova* 32: 2023-2025.
- Asakawa, Y.** 1999. Phytochemistry of bryophytes: biologically active terpenoids and aromatic compounds from liverworts. *In: Romeo, J.T. (org). Phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense. Recent advances in phytochemistry.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, v. 33, pp. 319-344.

- Ascensão, L., Francisco, A., Cotrin, H. & Pais, M.S.** 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92: 1059-1067.
- Barba, B., Diaz, J.G & Herz, W.** 1992. Anthraquinones and other constituents of two *Senna* species. In: *Phytochemistry* 31: 4374-4375.
- Barbosa Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. F. F. M., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., da-Cunha, E. V. L., Almeida, J. R. G. S. & Quintans-Júnior, L. J.** 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)*. 16: 258-285.
- Barneby, R.C.** 1991. *Sensitivae Censitae* – a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. The New York Botanical Garden. New York.
- Barreiro, E.J, Fraga, C.A.M. & Araújo Jr., J.X.** 2007. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 147-210.
- Barros, G.M & Teixeira, S.P.** 2008. Estudo farmacobotânico de duas espécies de anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*, Leguminosae) com propriedades farmacológicas. In: *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 287-294.
- Beal, W.J.** 1878. Hairs and glandular hairs of plants, their forms and uses. *The American Naturalist*. 12: 271-282.
- Behnke, H.D.** 1984. Plant trichomes, structure and ultrastructure: general terminology, taxonomics applications and aspects of trichome-bacteria interaction in leaf tips of *Dioscorea*. In: Rodriguez, E., Healey, P.L. & Mehta, I. (org.) *Biology and Chemistry of plant trichomes*. Plenum Press, New York. pp. 01-21.
- Benthán, G. & Hooker, J.D.** 1862. *Genera Plantarum*. Pars I, pp. v-vi. Pars II, pp. 434-437.
- Bird, D.A., Franceschi, V. R. & Facchini, P.J.** 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell* 15: 2626-2635.
- Bouzon, Z.L.** 2006. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 29: 229-238.

- Braggio, M.M., Lima, M.E.L., Veasey, E.A. & Haraguchi, M.** 2002. Atividade farmacológica das folhas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Arquivos do Instituto Biológico 69: 49-53.
- Brito, C.J.F.A. & Alquini, Y.** 1996. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). Arquivos de Biologia e Tecnologia 39: 949-951.
- Bruneton, J.** 1995. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier/Andover: Intercept, Paris.
- Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P. & Tani, C.** 1998. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient detected by histochemical and ultrastructural analyses. New Phytologist 138: 469-479.
- Bustamam, A., Ibrahim, S., Al-Zubairi, A.S., Met, M. & Syam, M.M.** 2008. Zerumbone: a natural compound with anti-cholinesterase activity. American Journal of Pharmacology and Toxicology 3: 209-211.
- Cain, A.J.** 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarter Journal of Microscopy Science 88: 383-392.
- Cardoso, C.M.V. & Sajo, M.G.** 2004. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. Revista Brasileira de Botânica 27: 47-54.
- Cardoso, C.M.V. & Sajo, M.G.** 2006. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. Acta Botanica Brasilica 20: 657-669.
- Carvalho, P.E.R.** 2004. Pau cigarra – *Senna multijuga*. Circular Técnica. EMBRAPA: Colombo.
- Carvalho Sobrinho, J. & Queiroz, L.P.** 2005. Composição florística de um fragmento de mata atlântica na Serra da Jibóia, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. Sitientibus Série Ciências Biológicas 5: 20-28.
- Carvalho, J.C.T., Gosmann, C. & Schenkel, E.P.** 2007. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 519-535.
- Castro, M.M. & Demarco, D.** 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communication 3: 1273-1284.

- Castro, M.M. & Machado, S.R.** 2003. Células e tecidos secretores. *In*: Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (ed.) Anatomia vegetal. EdUFV, Viçosa, pp. 179-204.
- Chamberlain, S.A. & Holland, J.N.** 2009. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecological Archives* 90: 2384-2392.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A.C. & Pagni, A.M.** 2001. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* 88: 637-644.
- Cielo Filho, R. & Santin, D.A.** 2002. Estudo florístico e fitossociológico de um fragmento florestal urbano - Bosque dos Alemães, Campinas, SP *Revista Brasileira de Botânica* 25: 291-301.
- Clark, G.** 1973. Staining procedures. 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Córdoba, E., Salmi, M. & León, P.** 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 60: 2933-2943.
- Corrêa, M.J.P., Garcia, M.I.R. & Arnal, A.O.** 2002. Caracterización histoquímica de la etapa temprana del desarrollo del fruto del olivo (*Olea europeae* L.). *Acta Botanica Brasilica* 16(1): 77-82.
- Corrêa, M.F.P., Mello, G.O. & Costa, S.S.** 2008. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 785-797.
- Corsi, G. & Biasci, D.** 1998. Secretory structures and localization of alkaloids in *Conium maculatum* L. (Apiaceae). *Annals of Botany* 81: 157-162.
- Costa, A. F.** 2000. Farmacognosia: farmacognosia experimental. 3 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. v. III, pp. 2-117.
- Cronquist, A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Coutinho, L.M.** 2009. O conceito de Mata Atlântica. *In*: Lopes, M.I.M.S., Kirizawa, M. & Melo, M.M.R.F. Patrimônio da reserva biológica do alto da serra de Paranapiacaba – a antiga estação biológica do Alto da Serra. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 101-103.
- Custódio Filho, A. & Mantovani, W.** 1986. Flora fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). *Hoehnea* 13: 113-140.

- David, R. & Carde, J.P.** 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. Académie des Sciences Paris, Série D, 258: 1338-1340.
- De-Paula, O. C. & Oliveira, D. M. T.** 2007. Variação da estrutura carpelar em seis espécies de Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae). Acta botanica brasílica 21: 915-925.
- Dickison, W.C.** 1981. The evolutionary Relationships of the Leguminosae. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. Advances in legume systematics, part 1. Royal Botanic Garden. Kew.
- Duffey, S.S.** 1986. Plant glandular trichomes: their partial role in defense against insects. In: Juniper, B.E. & Southwood, T.E. (ed.) Insects and the plant surface. Arnold, London. pp: 151-172.
- Durkee, L.T.** 1982. The floral and extrafloral nectaries os Passiflora. II – The extrafloral nectary. American Journal of Botany 69: 1420-1428.
- Dutra, M.S.** 2008. Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Evans, W. C.** 2002. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15 ed. Saunders, London.
- Fahn, A.** 1974. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn, A.** 1988. Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist 108: 229-257.
- Fahn, A.** 2000. Structure and function of secretory cells. Advances in Botanical Research 31: 37-75.
- Falkenberg, M.B.** 2007. Quinonas. In: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 657-683.
- Falkenberg, M.B., Santos, R.I. & Simões, C.M.O.** 2007. Introdução à análise fitoquímica. In: C.M.O Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 229-246.
- Fank-de-Carvalho, S.M. & Graciano-Ribeiro, D.** 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). Acta Botanica Brasilica 19: 377-390.

- Farias, M. R.** 2007. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 263-288.
- Feder, N. & O'Brien, T.P.** 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 128-142.
- Fernandes, S.D.C.** 2007. Morfologia, anatomia, histoquímica e aspectos fisiológicos da lâmina foliar de espécies de *Clusia* (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Fernie, A.R.** 2007. The future of metabolic phytochemistry: largers numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry* 68: 2861-2880.
- Ferreira, R.A., Davide, A.C. & Motta, M.S.** 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes* 26: 24-31.
- Figueiredo, A.C.S., Barroso, J.M.G., Pedro, L.M.G. & Ascensão, L.** 2007. Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos. <http://www.cbv.fc.ul.pt/histoquimicapp> (acesso em 19.07.2008).
- Fico, G., Bilia, A.R., Morelli, I. & Tomè, F.** 2000. Flavonoids distribution in *Pyracantha coccinea* plants at different growth phases. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28: 673-678.
- Fiuza, T.S., Rezende, M.H., Sabóia-Morais, S.M.T., Bara, M.T.F. Tresvenzol, L.M.F. & Paula, J.R.** 2008. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia* 5: 1-11.
- Fonseca, M.C.M., Meira, R.M.S.A. & Casali, V.W.D.** 2006. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). *Planta Daninha* 24: 707-713.
- Forero, E.** 2005. Introducción. In: Forero, E. & Romero, C. Estudios en leguminosas colombianas. Bogotá.
- Franceschi, V.R. & Nakata, P.A.** 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review Plant Biology* 56: 41-71.
- Furr, M. & Mahlberg, P.G.** 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.

- Gahan, P.B.** 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press, London.
- Ganter, P. & Jollés, G.** 1969 / 1970. Histologie normale et pathologique. v I, II. Gauthier – Villars, Paris.
- Gazoni, V.F.** 2009. Análise fitoquímica e avaliação do efeito anticolinesterásico do extrato e compostos isolados da *Rapanea ferruginea*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina.
- Geissman, T.A. & Crout, D.H.G.** 1969. Organic chemistry of secondary plant metabolism. Freeman, Cooper & Company, San Francisco.
- Gerlach, D.** 1969. Botanische mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.
- Gersbach, P.V., Willie, S.G. & Sarafis, V.** 2001. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany* 88: 521-525.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova* 30: 374-381.
- Gould, K. S. & Lister, C.** 2006. Flavonoid functions in plants. *In: Andersen, O.M. & Markham, K.R. (ed.). Flavonoids – Chemistry, biochemistry and applications.* Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 397-441.
- 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.
- Gross, G.G.** 1999. Biosynthesis, biodegradation, and cellular localization of hydrolyzable tannins. *In: Romeo, J.T. (org). Phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense. Recent Advances in Phytochemistry, v. 33.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp.185-213.
- Guarim Neto, G. & Morais, R. G.** 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasílica* 17: 561-584.
- Guerra, M.P. & Nodari, R.O.** 2007. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In: C.M.O Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed.* Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 13-28.

- Häkkinen, S.T., Tilleman, S., Swiatek, A., Sutter, V., Rischer, H., Vanhoutte, I., van Onckelen, H., Hilson, P., Inzé, D., Oksman-Caldentey, K.M. & Goossens, A.** 2007. Functional characterization of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry* 68: 2773-2785.
- Harborne, J.B.** 1968. Biochemical systematics – the use of chemistry in plant classification. *In: Reinhold, L. & Liwschitz, Y. Progress in phytochemistry.* Interscience Publishers, London. v. 1, pp. 545-588.
- Harborne, J.B.** 1995. *Ökologische biochemie: eine einföhrung.* Spectrum, Heidelberg.
- Harborne, J.B.** 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Reports* 18: 361-379.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to echochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.
- Haslam, E.** 2007. Vegetable Tannins – Lessons of a Phytochemical Lifetime. *Phytochemistry* 68: 2713–2721.
- Heldt, H.W.** 1996. *Pflanzenbiochemie.* Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/ Oxford, pp. 393-437.
- Henriques, A.T., Kerber, V.A. & Moreno, P.R.H.** 2007. Alcalóides, generalidades e aspectos básicos. *In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp 765-791.
- Hickey, L.J.** 1973. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany* 60: 17-33.
- Hohmann, B., Reher, G. & Stahl-Biskup, E.** 2001. *Mikroskopische drogenmonographien der deutschsprachigen arzneibücher.* Reiche Pharmazeutische Biologie. Band 3. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Hutchinson, J.** 1964. *The genera of flowering plants.* Claredon Press, New York.
- Ikan, R.** 1991. *Natural products:a laboratory guide.* 2. ed. Academic Press, San Diego.
- Ikuno, A.A., Braggio, M.M. & Haraguchi, M.** 2003. Antiherpes activities of fractions from *Sesbania virgata* leaves. *Arquivos do Instituto Biológico* 70: 183-185.
- Jensen, W.A.** 1962. *Botanical histochemistry.* WH Freeman and Co., San Francisco.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant microtechnique.* McGraw-Hill, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J.** 2009. *Sistemática vegetal – um enfoque filogenético.* 3ª ed. Porto Alegre: ARTMED.

- Karban, R., English-Loeb, G., Walker, M.A. & Thaler, J.** 1995. Abundance of phytoseiid mites on *Vitis* species: effects of leaf hairs, domatia, prey abundance and plant phylogeny. *Experimental & Applied Acarology* 19: 189-197.
- Khasim, S.M.** 2002. Botanical microtechnique. Capital Publishing Company, New Delhi.
- Kotchekoff-Henriques, O., Joly, C.A. & Bernacci, L.C.** 2005. Relação entre o solo e a composição florística de remanescentes de vegetação natural no Município de Ribeirão Preto, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 541-562.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro.
- Kunz, A.** 2002. Non-cognitive benefits of galantamine (Reminyl) treatment in vascular dementia.=*Acta Neurologica Scandinava* 106(suppl. 178): 19-24.
- Kuster, R.M. & Rocha, L.M.** 2007. Cumarinas, cromonas e xantonas. *In*: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 537-556.
- Lambers, H., Chapin, F.S. & Pons, T. L.** 1998. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Lapa, A. J., Souccar, C., Lima-Landman, M. T., Godinho, R. O. & Lima, T. C. M.** 2007. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. *In*: C.M.O Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, (orgs.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 247-262.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Larsson, S.** 2007. The “new” chemosystematics: phylogeny and phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2903–2907.
- Laurance, W. F.,** 2009. Conserving the hottest of the hotspots. *Biological Conservation* 142: 1137.
- Levin, D.A.** 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* 48: 3-15.
- Lewis, G.P., Schrire, B., Macknider, B. & Lock, M.** 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Garden. Kew.
- Lima, C.L.R., Reinert, D.J. , Reichert, J.M. ,Suzuki, L.E.A.S. & Gubiani, P.I.** 2006. Qualidade físico-hídrica e rendimento de soja (*Glycine max* L.) e feijão (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) de um Argissolo Vermelho distrófico sob diferentes sistemas de manejo. *Ciência Rural*. 36: 1172-1178.
- Lison, L.** 1960. *Histochimie et citochimie animales: principes et methodes*. 5. ed. Gauthier Villar, Paris.
- Lombardo, M., Kiyota, S. & Kaneko, T.M.** 2009. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). In: *Revista de Ciências Farmacêuticas – básica e aplicada* 30: 01-09.
- Lorenzi, H.** 1998. *Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. v. 1. Plantarum, Nova Odessa.
- Luckner, M., Dietrich, B. & Lerbs, W.** 1980. Cellular compartmentation and channelling of secondary metabolism in microorganisms and higher plants. In: Reinhold, L., Harborne, J.B. & Swain, T. (ed.). *Progress in phytochemistry*. Pergamon Press, Oxford, v. 6, pp. 103-142.
- Mace, M.E. & Howell, C.R.** 1974 Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426.
- Macías, F. A., Galindo, J. L. G. & Galindo, J. C. G.** 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917–2936.
- Maffei, M.E., Mithöfer, A. & Boland, W.** 2007. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68: 2946-2959.
- Mantovani, M.C., Scachetti, A.L., Garrido, O., Mikami, L., Spina, L., Herrera, A. & Maejima, W.K.** 2010. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2008 a 2010. SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. <http://www.sosmatatlantica.org.br> (acesso em 20.06.2010).
- Marinho, R.O.S.** 2008. Estudo fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Mariot, M.P. & Barbieri, R.L.** 2007. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 9: 89-99.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K.** 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor in plants. *Phytochemical Analysis*. 13: 51-54.

- Martins, M.B.G., Martins, R.G.M. & Cavaleiro, J.A.** 2009. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*). In: Revista Biociências 14: 127-140.
- Matos, C.H.C., Pallini, A., Chaves, F.F. & Galbiati, C.** 2004. Domácias do cafeeiro beneficiam o ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae)? Neotropical Entomology 33: 57-63.
- McKey, D.** 1989. Interactions between ants and leguminous plants. In: Stirton, C.H. & Zarucchi, J.L. (eds.) Advances in Legume Biology. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden 29: 673-718.
- McManus, J.F.A.** 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology 23:99-108.
- Menezes, N.L., Silva, D.C. & Pinna, G.F.A.M.** 2003. Folha. . In: Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (ed.) Anatomia vegetal. EdUFV, Viçosa, pp. 303-325.
- Metcalfe, C.R.** 1979. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. Anatomy of the dicotyledons. 2. ed. Clarendon Press, Oxford, v. 1, pp. 63-75.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L.** 1950. Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- Metzger, J. P.** 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. Biological Conservation 142: 1138–1140.
- Meyer, S.T., Silva, A.F., Marco Júnior, P. & Meira Neto, J.A.A.** 2004. Composição florística da vegetação arbórea de um trecho de floresta de galeria do Parque Estadual do Rola-Moça na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG, Brasil. Acta Botanica Brasilica 18: 701-709.
- Mineiro, J.L.C., Sato, M.E., Raga1, A., Arthur, V., Cangani1, K.G. & Barbosa, F.V.** 2006. Diversidade de ácaros (Arachnida: Acari) em cinco cultivares de duas espécies de cafeeiros (*Coffea* spp.) em Garça, Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto de Biologia 73: 333-341.
- Moreira-Coneglian, I.R. & Oliveira, D.M.T.** 2006. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). Revista Brasileira de Botânica 29: 193-207.
- Moyna, P. & Heinzen, H.** 2007. Lipídios: química y productos naturales que los contienen. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz,

- L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 435-466.
- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H. & De Luca, V.** 2008. The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *The Plant Cell* 20: 524-542.
- Nascimento-Silva, O., Chinalia, L.A. & Paiva, J.G.A.** 2008. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindl.). *Caatinga* 21: 62-68.
- Navarro, L.A., Duarte, L., Klein, R.C. & Heuser, E.D.** 2007. Caracterização dos cristais de oxalato de cálcio nas partes reprodutivas e vegetativas aéreas de *Ilex paraguaiensis* A. St. Hill. (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5: 762-764.
- O'Dowd, D.J & Pemberton, R.W.** 1998. Leaf domatia and foliar mite abundance in broadleaf deciduous forest of north Asia. *American Journal of Botany* 85: 70–78.
- Oberlaender, E.T.** 2006. Fenologia de *Senna macranthera* (Collad.) Irwin & Barneby e *Senna multijuga* (Rich.) Irwin & Barneby no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e na área urbana de Tersópolis, RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Oliveira, D.M.T.** 1999. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. *Revista Brasileira de Botânica*. 22: 413-427.
- Oliveira, R.R.** 2002. Ação antrópica e resultantes sobre a estrutura e composição da Mata Atlântica na Ilha Grande, RJ. *Rodriguesia* 53: 33-58.
- Oliveira, A.L.S. & Figueiredo, A.D.L.** 2007. Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). In: *Revista Brasileira de Biociências* 5: 384-386.
- Paiva, E.A.S. & Machado, S.R.** 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Acta Botanica Brasilica* 20: 471-482.
- Parham, R.A. & Kaustinen, H.M.** 1977. On the site of tannin synthesis in plant cells. *Botanical Gazette* 138: 465-467.
- Pearse, A.G.E.** 1961. Histochemistry: theoretical and applied. 2. ed. Churchill, London.
- Pearse, A.G.E.** 1980. Histochemistry theoretical and applied. 4. ed. C. Livingstone, Edinburgh.

- Pedroso, A.N.V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Pemberton, R.W & Turner, C.E.** 1989. Occurrence of predatory and fungivorous mites in leaf domatia, American Journal of Botany 76: 105-112.
- Pereira, J.A.A., Botelho, S.A. & Davide, A.C.** 1999. Desenvolvimento de espécies florestais de rápido crescimento em diferentes condições de sítio visando a recomposição de matas ciliares. Cerne 5: 36-51.
- Petersen, M.** 2007. Current status of metabolic phytochemistry. Phytochemistry 68: 2847-2860.
- Phillipson, J.D.** 2007. Phytochemistry and Pharmacognosy. Phytochemistry 68: 2960-2972.
- Pinto, A.C., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Lopes, N.P. & Epifanio, R.A.** 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova 25: 45-61.
- Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D.** 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21:56-64.
- Polhill, R.M., Raven, P.H. & Stirton, C.H.** 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. Advances in legume systematics, part 1. Royal Botanic Garden. Kew.
- Pozuelo, J.M., Lucas, M.M., Lorenzo, C., Fernández-Pascual, M., Maldonado, S. & Felipe, M.R.** 2001. Immunolocalization of alkaloids and X-ray microanalysis of elements in lupin seeds. Protoplasma 218: 104-111.
- Ramsey, J.C. & Berlin, J.D.** 1976. Ultra structure of early stages of liber differentiation. Botanical Gazzete 139: 11-19.
- Rates, S.M.K. & Bridi, R.** 2007. Heterosídeos cardioativos. In: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 685-710.
- Reis, C., Proença, S.L. & Sajo, M.G.** 2004. Vascularização foliar e anatomia do pecíolo de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Botanica Brasilica 18: 987-999.
- Reis, M.S., Mariot, A. & Steenbock, W.** 2007. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz,

- L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp:45-74.
- Reynolds, T.** 2007. The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* 68: 2887-2895.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J. & Hirota, M. M.** 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Rio, M.C.S., Kinoshita, L.S. & Castro, M.M.** 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 713-726.
- Rizzini, C.T. & Mors, W.B.** 1995. Botânica econômica brasileira. 2. ed. Âmbito Cultural. Rio de Janeiro.
- Rodrigues, I.C.M.** 2008. Histoquímica e prospecção de compostos produzidos por *Senna alata* (L.) Roxb. com potencial atividade alelopática. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa. MG.
- Rodrigues, I.M.C., Souza Filho, A.P.S., Ferreira, F.A. Ilkui-Borges, F. & Gurgel, E.S.C.** 2009a. Anatomia e histoquímica das folhas de *Senna alata*. *Planta Daninha* 27: 515-526.
- Rodrigues, I.M.C., Souza Filho, A.P.S. & Ferreira, F.A.** 2009b. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha* 27: 507-513.
- Rodrigues, L.A., Carvalho, D.A., Oliveira Filho, A.T., Botrel, R.T. & Silva, E.A.** 2003. Florística e estrutura da comunidade arbórea de um fragmento florestal em Luminárias, MG. *Acta Botanica Brasilica* 17: 71-87.
- Rodrigues, R.S., Flores, A.S., Miotto, S.T.S. & Baptista, L.R.M.** 2005. O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19: 1-16.
- Roth-Nebelsick, A., Uhl, D., Mosbrugger, V. & Kerp, H.** 2001. Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Annals of Botany* 87: 553-566.
- Ruiz, R.E.L., Silva, R.A. & Ruiz, S.O.** 2003. Aislamento de esteroides, bases de amônio y saponinas de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gillies ex Hicken (Amaranthaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense* 22: 101-104.
- Samuelsson, G.** 1999. Drugs of natural origin. 4. ed. Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm.

- Sant'Anna-Santos, B.F., Thadeo, M. Meira, R.M.S.A. & Ascensão, L.** 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore* 30: 481-489.
- Santos, L.D.F., Thadeo, M., Iarema, L., Meira, R.M.S.A. & Ferreira, F.A.** 2008. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. *Revista Árvore* 32: 769-779.
- Santos, M.C.A., Freitas, S. de P., Aroucha, E.M.M. & Santos, A.L.A.** 2009. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *In: Revista de Biologia e Ciências da Terra* 9: 24-30.
- Santos, R.I.** 2007. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 403-434.*
- Santos, S.C. & Mello, J.C.P.** 2007. Taninos. *In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 615-656.*
- Saroya, A.S.** 2006. Glossary of Phytochemicals. Buziness Horizons, New Delhi.
- Schenkel, E.P., Gosmann, G. & Petrovick, P.R.** 2007a. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. *In: C.M.O Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, (orgs.). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6 ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 371-400.*
- Schenkel, E.P., Gosmann, G. & Athayde, M.L.** 2007b. Saponinas. *In: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 711-740.*
- Schnitzler, J.P., Jungblut, T.P., Heller, W., Köfferlein, M., Hutzler, P., Heinzmann, U., Schmelzer, E., Ernst, D., Langebartels, C. & Sandermann Jr, H.** 1996. Tissue licalization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of scots pine seedlings. *New Phytologist* 132: 247-258.
- Schultze-Menz, G.K.** 1964. Reihe Rosales. *In: Engler, A. Syllabus der Pflanzenfamilien, Band II. Gebrüder Borntraeger. Berlin.*

- Serrano, M.A.R.** 2006. Estudo da composição química de *Senna multijuga* (Leguminosae). Dissertação de mestrado, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, São Paulo.
- Serrano, M.A.R., Pivatto, M., Francisco, W., Danuello, A., Regasini, L.O., Lopes, E.M.C., Lopes, M.N., Young, M.C.M. & Bolzani, V.S.** 2009. Acetylcholinesterase Inhibitory Pyridine Alkaloids of the Leaves of *Senna multijuga*. In: Journal of Natural Products 73:482-484.
- Silva, A.M.L., Costa, M.F.B., Leite, V.G., Rezende, A.A. & Teixeira, S.P.** 2009. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. Hoehnea 36: 329-338.
- Silva, C.A., Alves, E.S. & Braga, M.R.** 2004. Aspectos morfoanatômicos e citoquímicos de folhas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex Schum.) e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae). Hoehnea 31: 215-223.
- Silva, G.B., Martim, L. Young, M.C.M. & Ladeira, A.M.** 2006. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. Hoehnea 33: 331-338.
- Silva, L.M., Alquini, Y & Cavallet, V.J.** 2005. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. Acta Botanica Brasilica 19: 183-194.
- Simões, C.M.O & Spitzer, V.** 2007. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 467-495.
- Simpson, M.G.** 2006. Plant Systematics. London, Elsevier.
- Singh, J.** 1981. Phytochemical investigation of *Cassia multijuga* seeds. In: Planta Medica 41: 397-399.
- Souza, V.C & Lorenzi, H.** 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. Plantarum, Nova Odessa.
- Strittmatter, C.G.D.** 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 15: 126-29.
- Sumner, B.E.H.** 1988. Basic histochemistry. John Wiley & Sons, Chichester.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia vegetal. 3. ed. ARTMED, Porto Alegre.
- Taktajan, A.** 1969. Flowering plants – origin and dispersal. Oliver & Boyd. Edimburg.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. & Agati, G.** 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of

- Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. New Phytologist 163: 547-561.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N. & Romani, A.** 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyria latifolia* exposed to excess solar radiation. New Phytologist 148: 69-77.
- Thadeo, M., Meira, R.M.S.A., Azevedo, A.A. & Araújo, J.M.** 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras de folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). In: Revista Brasileira de Botânica 32: 329-338.
- Theobald, W.L., Krahulik, J.L. & Rollins, R.C.** 1979. Trichome description and classification. In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. Anatomy of the dicotyledons. 2. ed. Clarendon Press, Oxford, v. 1, pp. 40-53.
- Tropicos.** 2010. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org> (acesso em 30.03.2010).
- Valkama, E., Juka-Pekka, S., Koricheva, J. & Pihlaja, K.** 2004. Changes in leaf trichomes and epicuticular flavonoids during leaf development in three birch taxa. Annals of Botany 94: 233-242.
- Veiga, M.P., Martins, S.S., Silva, I.C., Tormena, C.A. & Silva, O.H.** 2003. Avaliação dos aspectos florísticos de uma mata ciliar no Norte do Estado do Paraná Acta Scientiarum Agronomy 25: 519-525.
- Vermerris, W. & Nicholson, R.** 2006. Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht.
- Vesprini, J.L., Nepi, M. & Pacini, E.** 1999. Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* species. Plant Biology 1: 560-568.
- Viegas Junior, C.** 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Química Nova 26: 390-400.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V. S., Furlan, M., Fraga, C. A. & Barreiro, E.** 2004a. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. Química Nova. 27: 655-660.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V.S., Furlan, M., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Tomazela, D. & Eberlin, M.N.** 2004b. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. Journal of Natural Products 67: 908-910.

- Viegas Junior, C., Rezende, A., Silva, D.H.S., Castro-Gambôa, I e Bolzani, V.S.** 2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Química Nova* 29: 1279-1286.
- Von Poser, G.L. & Mentz, L.A.** 2007. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões, C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp.75-89.
- Wagner, G.J., Wang, E. & Shepherd, R.W.** 2004. New Approaches for studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.
- Wagner, H. & Bladt, S.** 2001. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2. ed. Springer, New York.
- Waller, G.R. & Nowacki, E.** 1978. *Alkaloid biology and metabolism in plants*. Plenum Press, New York.
- Watson, L.** 1981. An automated system of generic descriptions for Caesalpinioideae, and its application to classification and key-making. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. *Advances in legume systematics, part 1*. Royal Botanic Garden. Kew.
- Werker, E. & Fahn, A.** 1981. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.: development, ultrastructure, and secretion. *Botanical Gazette* 142: 461-476.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N. & Katzir, I.** 1994. Glandular hairs, secretory cavities, and the essential oil in leaves of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2: 19-32.
- Wilkinson, H.P.** 1979. The plant surface. In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. *Anatomy of the dicotyledons*. 2. ed. Clarendon Press, Oxford, v. 1, pp. 97-117.
- Yamazaki, Y., Kitajima, M., Arita, M., Takayama, H., Sudo, H., Yamazaki, M., Aimi, N. & Saito, K.** 2004. Biosynthesis of camptotecin. In silico and in vivo tracer study from [1-13C] Glucose. *Plant Physiology* 134: 161-170.
- Yazaki, K.** 2006. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 580: 1183-1191.
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G.** 1976. Reaction of alkaloid and histochemical indicator in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63: 1167-1173.
- Zamora-Natera, F, García-López, P., Ruiz-López, M., Rodrigues-Macías, R. & Salcedo-Pérez, E.** 2009. Composición y concentración de alcaloides en *Lupinus exaltatus* Zucc. durante su crecimiento y desarrollo. *Interciencia* 34: 672-676.

- Zenk, M. H & Juenger, M.** 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* 68: 2757–277.
- Ziegler, J. & Facchini, P.J.** 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59: 735-769.
- Zuanazzi, J.A.S. & Montanha, J.A.** 2007. Flavonídes. *In*: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 577-614.