



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BOTÂNICA TROPICAL

RAFAELA CABRAL DOS SANTOS-TRINDADE

CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E FARMACOBOTÂNICA DAS FOLHAS
DE *Aspidosperma excelsum* Benth. (APOCYNACEAE)

BELÉM

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BOTÂNICA TROPICAL

RAFAELA CABRAL DOS SANTOS-TRINDADE

CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E FARMACOBOTÂNICA DAS FOLHAS
DE *Aspidosperma excelsum* Benth. (APOCYNACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências
do Curso de Mestrado em Ciências
Biológicas: área de concentração
Botânica Tropical, para obtenção do
título de Mestre. Orientador: Prof.^a
Dr.^a Márlia Regina Coelho-Ferreira

BELÉM

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BOTÂNICA TROPICAL

RAFAELA CABRAL DOS SANTOS-TRINDADE

CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E FARMACOBOTÂNICA DAS FOLHAS
DE *Aspidosperma excelsum* Benth. (APOCYNACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: 20 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márlia Regina Coelho-Ferreira - Orientador

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

Prof. Dr.^a Maria Fâni Dolabela – Co-orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr.^a Alba Lúcia Ferreira de Almeida Lins – 1º Examinador

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

Prof. Dr.^a Cristine Bastos do Amarante – 2º Examinador

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

Prof. Dr.^a Fernanda Ilkiu Borges de Souza – 3º Examinador

EMBRAPA – AMAZÔNIA ORIENTAL

Dedico

À Deus, meu guardador, minha sabedoria, meu direcionador e meu melhor amigo.

Aos meus pais, que me ensinaram a almejar e alcançar meus sonhos.

Ao meu esposo, amigo, conselheiro, braço direito e grande amor.

Agradecimentos

A Universidade Federal Rural da Amazônia (**UFRA**) e ao Museu Paraense Emílio Goeldi (**MPEG**) pela formação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela bolsa concedida e apoio a pesquisa;

Ao projeto **Rede de Produtos Naturais para a Quimioterapia Antimalárica**, pelo apoio financeiro;

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal (**LAVEG**) pela estrutura concedida para realização de meu trabalho.

A coordenação da Pós-graduação, **Prof. Dr.º João Ubiratan Moreira dos Santos**, **Prof.ª Dr.ª Anna Luiza Ilkiu-Borges Benkendorff**, aos secretários, **Anderson** e **Rosangêla**, que sempre foram muito solícitos com nossas necessidades acadêmicas e todos os funcionários do MPEG.

A **Prof. Dr.ª Márlia Coelho-Ferreira** por todos os ensinamentos durante estes dois anos, por ter aceitado me orientar em área distinta da sua, pela confiança, por todo tempo dispensado nas correções de textos, pela paciência e todo suporte dado em minha formação e na realização de minha pesquisa;

A **Prof.ª Dr.ª Fâni Dolabela** por ter aceitado orientar um trabalho de parceria interdisciplinar, pelo apoio científico e financeiro. Por ter cedido sua casa em Belo Horizonte, para que eu pudesse ficar durante a realização dos experimentos fitoquímicos. Pelo incentivo, paciência e por todo tempo despendido não só com a orientação, mas com os ensinamentos de vida;

A **MSc. Tatiani Kikuchi**, sem sua imensa paciência e benevolência a realização da anatomia não seria possível. Obrigada por cada direcionamento, incentivo, cada estalo de ideia. Obrigada

por me acompanhar no laboratório, por cada lâmina analisada e cada parágrafo lido. Por todo ensinamento e amizade;

Ao **MSc. Rolf Júnior**, por sua imensa paciência e generosidade de me ajudar, pelo aprendizado, auxílio na parte experimental e escrita deste trabalho;

A **MSc. Tarcymara Garcia** por realizar o MEV de minhas amostras, pelos momentos de descontração e amizade;

Aos parceiros da **Faculdade de Farmácia da UFMG**, sobretudo à **Prof.^a Dr.^a Alaíde Braga**, por todos os ensinamentos e dedicação com minha pesquisa, no curto tempo que passei nesta instituição. A técnica **Raquel**, por sua imensa generosidade de nos acompanhar no laboratório até tarde da noite todos os dias. Ao **Dr.^o Célio Brandão** e **MSc. Douglas**, obrigada pela atenção e apoio dispensados. As atividades desenvolvidas nesta instituição não teriam sido possíveis sem o auxílio financeiro concedido pelo projeto **PNADB**;

Aos professores do curso de Pós-graduação e associados, pelas disciplinas ministradas, pelas discussões e ensinamentos;

Agradeço aos parobotânicos **Luiz Carlos Batista Lobato**, **Mario Rosa dos Santos Júnior**, **Ferdinando Cardoso** e ao motorista **Júlio Santos de Melo** pelas inúmeras tentativas de coletar material vegetal para realização deste trabalho;

A **Faculdade de Farmácia da UFPa**, pela estrutura disponibilizada à realização de parte de meu trabalho. E aos colegas **Valdiclei** e **Marcos**, por toda ajuda e apoio;

Ao **Dr.^o Alexandre Braggio Bonaldo**, pela permissão de uso do microscópio com câmera acoplada do Laboratório de Aracnologia do MPEG;

Aos meus colegas de turma: **Ana Claudia**, **André**, **Anneiry Anne**, **Arthur**, **Cássio**, **Jéssyca**, **Klissia**, **Ilka**, **Liliane**, **Luana**, **Madson**, **Maria**, **Marilene** e **Silvana**, pelo convívio e compartilhamento

de conhecimentos. Em especial aos colegas de laboratório **Edilson, Breno e Joana**, pelos momentos de descontração e força mútua;

Aos colegas do Laboratório de Etnobotânica, **Ronize, Pedro, Paula e Andriele**, obrigada pela convivência e por todo apoio;

Ao **Laboratório de Química do Cesupa, Prof. Drº. Davi** e ao técnico **Wellington**, por toda ajuda.

À técnica **Lidiane Diniz**, do Laboratório de Fitoquímica, agradeço por toda ajuda nos experimentos e análises, sobretudo nos cálculos de granulometria;

Aos meus pais, **Rita e Natalino**, pelo apoio contínuo, conselhos, incentivo e confiança, pelo exemplo de vida e pelo sacrifício financeiro de manter meus estudos. Ao meu irmão, **Arthur**, por ser especial pra mim. E ao meu querido esposo, **Diego**, por todas as lutas que vencemos juntos, pelo companheirismo, compreensão e pelo imenso amor.

Meu sincero agradecimento!

Sumário

REVISÃO DE LITERATURA	6
RESUMO	1
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	2
1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1.1. A família Apocynaceae Juss.	4
1.1.2. Aspectos taxonômicos do gênero <i>Aspidosperma</i> Mart. & Zucc.....	6
1.1.3. Aspectos fitoquímicos e farmacológicos de <i>Aspidosperma</i> Mart. & Zucc.....	8
1.1.3. Metabólitos secundários e estruturas secretoras.	12
1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
Capítulo 1: MARCADORES FARMACOGNÓSTICOS ÀS FOLHAS DE <i>Aspidosperma excelsum</i> BENTH (APOCYNACEAE).....	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e métodos.....	24
<i>Material botânico</i>	24
<i>Análises anatômica e histoquímica</i>	25
<i>Análises físicas, físico-químicas e fitoquímicas</i>	26
Determinação da distribuição granulométrica	26
Determinação do teor de cinzas totais	27
Obtenção dos extratos e frações	27
Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	27
Obtenção dos perfis cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28
Resultados	28
Análises anatômica e histoquímica.....	28
Análises físicas, físico-químicas e fitoquímicas	34
Discussão	39
Conclusões	43
Referências bibliográficas.....	44

Lista de Figuras e Tabelas

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Distribuição geográfica da família Apocynaceae.....	4
Figura 2: A. Indivíduo de <i>Aspidosperma excelsum</i> Benth.....	10
Figura 3: Alcaloides indólicos isolados de <i>A. excelsum</i>	11

CAPÍTULO 1

Figura 1: Mapa da área de coleta de <i>A. excelsum</i>	25
Figura 2: Vista superficial da lâmina foliar de <i>A. excelsum</i> Benth.....	29
Figura 3: Secções transversais de <i>A. excelsum</i>	31
Figura 4: Estruturas secretoras das folhas de <i>A. excelsum</i>	33
Figura 5: Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>A. excelsum</i>	35
Figura 6: CCD do Extrato etanólico de <i>A. excelsum</i>	37
Figura 7: Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD.....	38
Tabela 1: Testes histoquímicos das folhas de <i>A. excelsum</i>	34
Tabela 2: Rendimentos extrativos obtidos a partir das folhas de <i>A. excelsum</i>	35
Tabela 3: Prospecção fitoquímica por CCD do extrato etanólico das folhas de <i>A. excelsum</i>	36

RESUMO:

Aspidosperma excelsum Benth. é uma espécie amazônica conhecida tradicionalmente como carapanaúba, cujas cascas são frequentemente usadas no preparo de remédios caseiros para combater doenças do fígado, febres e, sobretudo, malária. Apesar disso, grande parte dos estudos já realizados refere-se apenas aos componentes químicos presentes nas cascas, com registros incipientes sobre a existência e concentração destes em demais órgãos da planta. O objetivo deste estudo foi caracterizar anatomicamente as folhas de *A. excelsum*, enfocando os sítios de produção e/ou acúmulo de compostos biologicamente ativos, bem como o perfil fitoquímico. Amostras foliares foram coletadas no município de Santa Bárbara-PA, fixadas e processadas segundo as técnicas usuais em anatomia vegetal. Foram feitas análises físico e físico-químicas, tais como a granulometria e cinzas totais do pó, e fitoquímicas constituídas por Cromatografia de Camada Delgada e de Alta Eficiência. O estudo anatômico revelou que a superfície foliar apresenta a face adaxial e abaxial constituídas por células heterodimensionais, revestidas por cutícula lisa e espessa na face adaxial e ornamentação restrita à face abaxial. Foram encontrados dois tipos de tricomas tectores unicelulares com ornamentação na parede, sendo um, afilado, localizado apenas sobre a nervura central da face abaxial e o outro observado entre a nervura e a margem de ambas as faces. A margem é ligeiramente revoluta, o mesófilo é dorsiventral e apresenta esclereídes colunares e macroesclereídes. A nervura central é plano-convexa, com feixes bicolaterais. O pecíolo é plano-convexo com braqui e macroesclereídes exclusivos ao parênquima fundamental. Laticíferos e idioblastos foram as estruturas secretoras observadas nas folhas. Os testes histoquímicos revelaram uma composição mista, constituída por compostos fenólicos, taninos, alcaloides e lipídeos totais. A prospecção fitoquímica confirmou a presença destes compostos, além de heterosídeos flavônicos e esteroides. Alcaloides foram detectados apenas na extração seletiva, demonstrando que se encontram em baixo teor na folha de *A. excelsum*. Estes dados poderiam justificar o uso das cascas pelas populações locais em detrimento das folhas; no entanto, estas devem ser consideradas como alvo de bioprospecção pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Carapanaúba, laticíferos, alcaloides, Amazônia.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Desde as primeiras civilizações, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas condições de vida, aumentando assim, suas chances de sobrevivência. O uso de plantas no tratamento de enfermidades é remoto (BALICK & COX, 1997). E o conhecimento e utilização de plantas medicinais representam, na maioria das vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002). Ainda hoje, em países emergentes e até mesmo nos de primeiro mundo, plantas medicinais são manejadas nas florestas, comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 55.000 espécies de angiospermas, quase 22% da flora mundial (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002). Dentre as diversas famílias botânicas existentes na região Amazônica, destaca-se a família Apocynaceae, sendo considerada uma das maiores das angiospermas (RAPINI, 2000). Inclui aproximadamente 250 a 550 gêneros e 3.700 a 5.100 espécies, estando bem representada nos diferentes biomas (RAPINI, 2004). Com relação ao Brasil, existem cerca de 750 espécies subordinadas a 70 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2012), que podem ser encontradas em diversos domínios fitogeográficos como: Florestas Pluviais, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e de Tabuleiro, Florestas Secas, Restingas, Cerrado e Caatinga (JOLY, 1993; BARROSO et al., 1991).

A família é composta por espécies de suma relevância econômica, algumas são fornecedoras de madeira e outras são consideradas importantes fonte vegetal, por apresentar constituintes químicos de utilidade para medicina (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). Estes constituintes são secretados e/ou armazenados por estruturas secretoras ou glândulas, podendo ser compostos primários e secundários, tais como: carboidratos, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides (METCALFE & CHALK, 1950; RIZZINI & MORS, 1976).

Dos mais de 550 gêneros dessa família, *Aspidosperma* Mart. & Zucc. destaca-se, por ser de incontestável valor econômico, como: madeireiro, farmacológico, medicinal e ecológico, muito utilizado na região Amazônica e de grande interesse para programas de reflorestamento (RIZZINI, 1971; LORENZI, 1998).

As aspidospermas amazônicas são conhecidas popularmente como carapanaúbas e são muito semelhantes morfológicamente, a taxonomia do grupo ainda é confusa, sobretudo no que diz respeito à diferenciação das espécies (REIS, 2008). Atualmente a revisão sistemática mais utilizada para a determinação do gênero é a de Woodson (1951) e Marcondes-Ferreira (1988).

Uma ferramenta muito valiosa para auxiliar na taxonomia do grupo são os estudos anatômicos, que apesar de insuficientes têm se mostrado eficazes para tal objetivo (ALBUQUERQUE, 1971; REIS, 2008). Santos et al. (2009) corroboram com esta ideia quando

afirmam que conhecer aspectos anatômicos de plantas medicinais é extremamente relevante tanto para a realização de manejo adequado, quanto para amparar estudos sobre a efetividade das drogas vegetais.

Neste sentido, a abordagem anatômica pode contribuir com constatações mais refinadas a partir das quais é possível identificar compostos aspirantes ao desenvolvimento de fitofármacos e/ou fitoterápicos, porque permitem localizar as estruturas secretoras e o momento em que estão em pleno desenvolvimento (MING, 1994). Além do diagnóstico das principais classes de metabólitos secundários presentes no exsudado.

A investigação de compostos químicos que são peculiares a espécies vegetais, também constituem bons marcadores quimiotaxonômicos para diferenciação dos táxons.

Na Amazônia as espécies de aspidospermas mais utilizadas são: *A. excelsum* Benth. ex Müll. Arg., *A. auriculatum* Markgr., *A. marcgravianum* Woodson, *A. carapanauba* Pichon e *A. desmanthum* Benth. ex Müll. Arg. (BRANDÃO, et al. 1992; MILLIKEN, 1997). As cascas de *A. excelsum* são indicadas para o tratamento de malária por nativos de diferentes locais da Amazônia (BRANDÃO ET AL., 1992; MEJIA & RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002; OLIVEIRA et al., 2003), bem como para problemas estomacais e de indigestão, diabetes, inflamações do útero, ovário e do estômago, contra câncer e como contraceptivo (CHEVALIER, 1996; RIBEIRO, et al. 1999).

Diante do exposto, e ainda sabendo que os produtos naturais não se apresentam com uma composição definida e padronizada (LAPA et al. 2007), por serem vulneráveis às condições ambientais e de desenvolvimento, uma abordagem de pesquisa multidisciplinar de *A. excelsum* torna-se pertinente.

Não obstante a casca do tronco seja a única parte utilizada na terapia tradicional, Añez (2009) encontrou metabólitos secundários similares e diferentes nas folhas, isto o levou a sugerir que as folhas sejam consideradas nos futuros estudos de bioprospecção pela indústria. Considerando ainda que a ampla exploração das cascas de *A. excelsum* por comunidades tradicionais poderia por em risco a conservação dessa espécie, e devido à escassez de conhecimento sobre características anatômicas e químicas de suas folhas, o presente trabalho visa investigar aspectos farmacognósticos e farmacobotânicos da folha de *A. excelsum*.

O presente trabalho está inserido no projeto maior intitulado “Rede de produtos naturais para a quimioterapia antimalárica”, coordenado pela UFMG em parceria com a UFPA e MPEG, entre outras instituições (Processo: 555655/2009-1). Possui uma abordagem quimiotaxonômica (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006), em que a espécie *A. excelsum* foi selecionada apoiando-se em dados fitoquímicos para o gênero, disponíveis na literatura (AÑEZ 2009; GOMES 2011; MARTINS 2012).

Os objetivos específicos desta pesquisa são: elucidar a morfoanatomia das folhas de *A. excelsum*; localizar suas estruturas secretoras e/ou armazenadoras; averiguar a composição química *in situ* através da histoquímica; obter perfil químico geral utilizando a fitoquímica e verificar aspectos farmacognósticos da droga vegetal.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. A família Apocynaceae Juss.

Apocynaceae Juss. constitui uma das dez maiores famílias de angiospermas em termos de espécies (THORNE, 1992). A mesma está circunscrita na ordem Gentianales, clado Asteridae (APG III, 2009), apresenta distribuição pantropical e subtropical, com o centro de diversidade nos neotrópicos, porém com pouca representatividade em regiões temperadas, estando ausente na Antártica (Figura 1) (RAPINI, 2004).

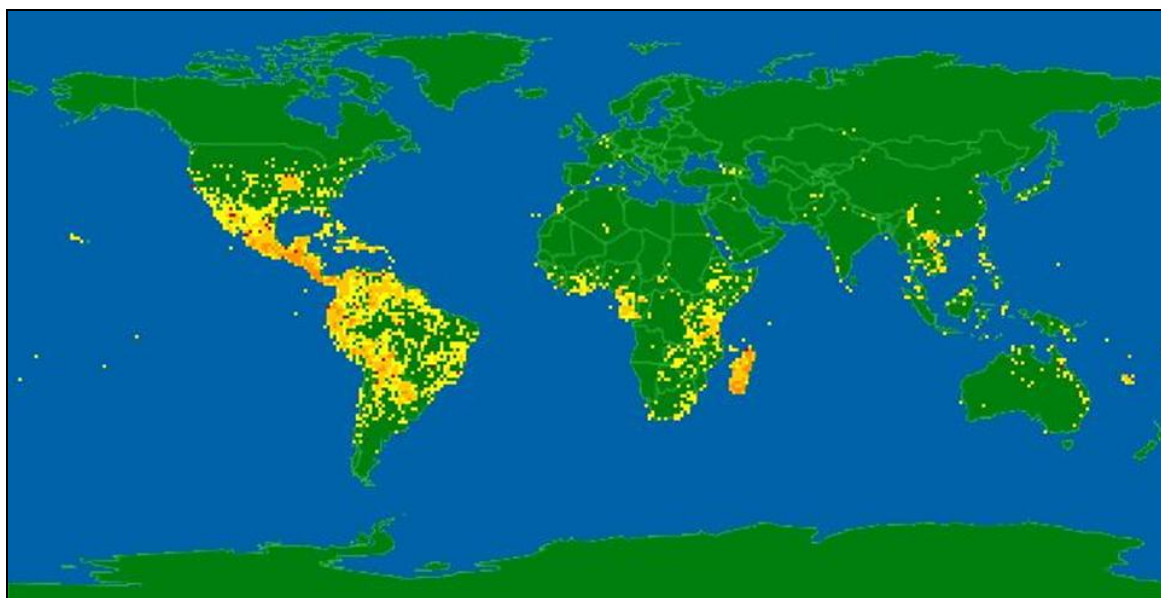


Figura 1: Distribuição geográfica da família Apocynaceae. Fonte: (<http://www.tropicos.org/Name/42000278?tab=maps>).

A família foi descrita, pela primeira vez, por Jussieu em 1879 como “Apocinea” (SENNBLAD & BREMER, 1996). Bartling (1830) foi o pioneiro a reunir as famílias tradicionalmente associadas à ordem Gentianales, constatando que o taxa possuía flores com estivação contorcida, denominou-o de Contortae. Todavia foi Lindley (1833) quem atribuiu a descrição formal para a ordem e o pioneiro a usar consistentemente o sufixo “ales”, que denota o

grau de ordem, além disso, juntou Apocynaceae e Asclepiadaceae na mesma ordem. Em 1945, Lindley alocou Apocynaceae em Gentianales e Asclepiadaceae em Solanales (ENDRESS, 2004).

Robert Brown foi um dos pesquisadores mais influentes na classificação de Apocynaceae *lato sensu* (*l.s.*), pois descreveu mais de 40 gêneros, a maioria, válidos até hoje. Quando Brown começou a estudar a família existiam apenas 53 gêneros e 170 espécies em Apocynaceae e Asclepiadaceae, conhecidas. Atualmente, passados 200 anos aproximadamente, Apocynaceae *l.s.* é constituída por 395 gêneros e 5.100 espécies. Brown também reconheceu as subfamílias Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae dentro de Asclepiadaceae (ENDRESS & BRUYNS, 2000; MEVE, 2002; ENDRESS, 2004).

Na classificação de Cronquist (1981), Asclepiadaceae e Apocynaceae *stricto sensu* (*s.s.*) foram facilmente distinguidas pela presença ou não de polinários, respectivamente. A adoção dos princípios da sistemática filogenética na taxonomia do grupo, no entanto, levou a fusão dessas famílias em Apocynaceae *l.s.* (RAPINI, 2000).

Nos anos 90 iniciaram-se investigações cladísticas baseados em dados morfoanatômicos, embriológicos (JUDD et al., 1994; STRUWE et al., 1994) e do gene Ribulose-1, 5-Bifosfato Carboxilase (*rbcL*) (SENNBLAD & BREMER, 1996; 2000), as quais mostraram a família Asclepiadaceae como um clado derivado, porém quando separada de Apocynaceae *s.s.*, esta última tornava-se um clado parafilético. Assim, os especialistas do grupo vincularam as duas famílias em uma única, Apocynaceae *l.s.* Esta foi a maneira mais acessível de alcançar um clado monofilético. Desta forma, Asclepiadaceae foi reconhecida como Asclepiadoideae, uma subfamília dentro de Apocynaceae *l.s.* (QUINET & ANDREATA, 2005).

Portanto delimitadas, o clado passou a ser dividido em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (ENDRESS & BRUYNS, 2000; ENDRESS et al., 2007). Três delas são dominantes na região neotropical, Asclepiadoideae, Rauvolfioideae e Apocynoideae, as duas últimas correspondendo às antiga família Apocynaceae *s.s.*

As subfamílias Rauvolfioideae e Asclepiadoideae constituem o clado mais basal e derivado de Apocynaceae respectivamente. Rauvolfioideae engloba a espécie do presente estudo e normalmente apresenta os lóbulos da corola sinistrorsamente contorcidos em botão, as anteras são em sua maioria não especializadas e livres a partir da cabeça do estilete, e há uma grande variedade de tipos de frutos e sementes, embora as sementes sejam quase sempre não comosas. Com a exceção da hipótese de Woodson (1930), Rauvolfioideae tem sido geralmente considerada basal e mais heterogênea do que Apocynoideae. Esta premissa também é suportada por todas as análises moleculares do grupo (ENDRESS & BRUYNS, 2000).

Os integrantes da família Apocynaceae *l.s.* apresentam hábito variável, que vai de árvores a trepadeiras ou ervas pequenas, incluindo algumas suculentas (RAPINI, 2012). É composta por 5.100 espécies distribuídas praticamente no mundo todo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (RAPINI, 2004).

A morfologia do aparelho polinizador de Apocynaceae é heterogênea, vão desde uma organização simples, com anteras totalmente férteis que se posicionam livres do estilete, a uma complexa compartimentação de órgãos não fusionados, incluindo anteras estéreis que são basalmente conadas a um estilete alargado na região apical, muitas vezes chamado de cabeça do estilete (clavícula) e anexos do tubo da corola. O gineceu consiste geralmente em dois carpelos e é sincárpico ou secundariamente apocárpico. Os tipos de frutos incluem bagas, drupas e folículos e as sementes podem ser aladas, comosas ou ariladas (SENNBLAD & BREMER, 1996).

As plantas da família são caracteristicamente laticíferas e produzem vários alcalóides e cardenólídeos, alguns dos quais possuem propriedades medicinais. Sendo assim considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Os gêneros mais importantes dessa família são *Alstonia* R. Br., *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Rauwolfia* Gled., *Vinca* L., *Nerium* L., *Strophantus* DC., *Catharanthus* G. Don, *Allamanda* L., e *Wrightia* R. Br. (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). No que diz respeito a espécie, a mais conhecida é *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, que contém vimblastina e vincristina, compostos usados mundialmente para o tratamento infantil de leucemia (SENNBLAD & BREMER, 2002).

1.1.2. Aspectos taxonômicos do gênero *Aspidosperma* Mart. & Zucc.

O gênero *Aspidosperma* Mart. & Zucc. foi descrito pela primeira vez por Matieus (1824), tal denominação provém do grego e significa “semente em forma de escudo”. Este gênero foi baseado em cinco espécies: *A. tomentosum*, *A. macrocarpon*, *A. refractum*, *A. bicolor* e *A. pyrifolium*, sendo a primeira a espécie Tipo (WODSON, 1951).

Aspidosperma foi publicado originalmente em *Nova Genera at Species Plantarum* (MARTIUS, 1824). A primeira revisão foi realizada por De Candolle (1844) em um estudo sobre as apocynáceas, onde avaliou dezenove espécies até então conhecidas, descreveu nove espécies novas e transferiu uma espécie de outra família (*Bignonia latisiliqua* Poir) para *Aspidosperma*.

Atualmente a revisão sistemática mais utilizada para a determinação das espécies é a de Woodson (1951). Espécies distintas estavam sendo classificadas com o mesmo nome, então o autor agrupou 52 espécies em 9 séries, Macrocarpa, Ramiflora, Pyricolla, Polyneura, Rigida, Nitida,

Stegomeria, Quebrachines e Nobile, levando em consideração suas características morfológicas. Posteriormente, Bolzani et al. (1987) propôs uma nova classificação baseada em aspectos quimiotaxonômicos, agrupando 48 espécies em oito séries: Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa. Desde então mais dezoito espécies novas foram descritas por outros autores. E são necessários mais estudos dos integrantes do gênero, devido à importância destes para a química e farmacologia, bem como pelo seu valor na composição florística de diversas formações, tais como, cerrado, mata atlântica, chaco, caatinga, floresta amazônica, etc (MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988).

De acordo com Barroso et al., (1991), o gênero *Aspidosperma* está submetido ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília Plumerioideae e a Tribo Plumerieae.

Apresenta entre 44 (MARCONDES-FERREIRA, 1988) e 55 espécies (ALLORGE & POUPAT, 1991), com distribuição nos neotrópicos. Os representantes deste grupo são árvores que variam de 2-60 m de altura e crescem em grande variedade de habitats, constituindo áreas secas do centro-sul e sudeste do Brasil, Paraguai e Argentina, áreas alagadas como as margens dos rios amazônicos e em altitudes de poucos metros acima do nível do mar com até aproximadamente 2000 m, como o leste do Peru e da Bolívia (WOODSON, 1951).

Algumas destas são fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria e outras são usadas popularmente para doenças do fígado, resfriados, febre e como analgésicos (JOLY, 1993; LORENZI, 1998; OBITZ, et al. 1997).

Os representantes do gênero possuem tronco cilíndrico ou tabular, látex branco ou avermelhado por oxidação. Folhas alternas ou espiraladas, excepcionalmente opostas. Inflorescências terminais em corimbo, cálice pentapartido sem glândulas na base, corola hipocrateriforme com quatro a cinco lóbulos sinistrorsos, frequentemente contorcidos, estames com filetes curtos inseridos no tubo da corola, anteras inteiramente férteis, indumento infra estaminal, dois ovários glabros ou pubescentes súperos ou semi-ínteros, clavícula globulosa. Fruto com um a dois folículos comprimidos, lenhosos, com deiscência formando duas valvas. Sementes com asas orbiculares membranosas, translúcidas, cotilédones codiformes albuminados (ALLORGE & POUPAT, 1991).

Na Amazônia brasileira as aspidospermas são conhecidas tradicionalmente como "carapanaúbas", palavra que significa "casa de carapanã" em alusão as cascas sulcadas do tronco que servem como abrigo para a reprodução destes insetos (VIEIRA, 2011). Em outras regiões do Brasil as espécies de *Aspidosperma* são conhecidas como perobas, guatambus, pau-pereiro, amargoso e quina (CORRÊA, 1931).

As carapanaúbas são muito semelhantes morfologicamente. A taxonomia do grupo ainda é confusa, sobretudo no que diz respeito à diferenciação das espécies (REIS, 2008).

Estudos químicos do gênero podem auxiliar na diferenciação das espécies. Tais como o de Gilbert (1966), que investigou o efeito do clima e solo sobre a produção de alcaloides no gênero e constatou que *A. macrocarpon*, que ocorre no domínio fitogeográfico Amazônia e Cerrado e *A. tomentosum* que ocorre tanto na Amazônia quanto na Caatinga e Cerrado apesar de crescerem em condições provavelmente idênticas apresentaram completa distinção quanto ao conteúdo de alcaloides, por outro lado *A. macrocarpon* do Cerrado e *A. duckei* da Amazônia mostraram identidade completa, esta decorrendo devido ao parentesco botânico, concluindo então que o conteúdo alcaloidífero não é determinado pelo solo e clima. Contudo, informações fitoquímicas de estudos realizados sugerem que as variações sazonais, como temperatura, umidade e aspectos edáficos podem influenciar na biossíntese e acúmulo de metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2009).

1.1.3. Aspectos fitoquímicos e farmacológicos de *Aspidosperma* Mart. & Zucc..

O gênero *Aspidosperma* é distinguido quimicamente pela ocorrência de alcaloides indólicos, característica compartilhada com outros gêneros de Apocynaceae e também com representantes de outras famílias, como Loganiaceae e Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 1987). Diversos trabalhos realizaram a isolamento e identificação de alcaloides de *Aspidosperma* e constataram que a classe de indólicos é comum na maioria das espécies (DASTOOR *et al.*, 1967; SIMÕES *et al.*, 1976; NUNES *et al.*, 1992; PEREIRA *et al.*, 2006). Totalizando cerca de 250 isolados até hoje (BOLZANI *et al.*, 1987; JÁCOME, 1998; PEREIRA *et al.*, 2007).

Até 1956 eram conhecidos apenas 4 alcaloides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma* (JÁCOME, 1998). Atualmente, pelo menos 157 já foram extraídos, identificados e isolados (SCHMUTZ, 1960; ROBERT, 1982). Estes compostos são empregados amplamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (LYON, *et al.* 1973; BENOIT *et al.*, 1889). Nativos de diferentes locais da Amazônia também empregam as cascas de *A. album* (Vahl) Benoist ex Pichon, *A. discolor* A. DC. e *A. polyneurum* Müll. Arg. no tratamento da malária (BRANDÃO *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Com relação a atividade biológica dos extratos de espécies de *Aspidosperma*, sabe-se que os extratos das folhas e cascas de *A. ramiflorum* se mostraram ativos contra *Escherichia coli* (AGRIPINO *et al.*, 2004). Mesquita *et al.* (2007) também obtiveram resultados satisfatórios com o

extrato etanólico das raízes de *A. macrocarpon* em atividade contra *Plasmodium falciparum*. Ainda, Dolabela et al. (2012) testaram *in vitro* 23 extratos de diferentes partes das espécies *A. cylindrocarpon* Müll. Arg., *A. parvifolium* A.DC., *A. olivaceum* Müll. Arg., *A. ramiflorum* Müll. Arg., *A. spruceanum* Benth. ex Müll. Arg. e *A. tomentosum* Mart., contra cepas de *P. falciparum* sendo que todos foram ativos e os extratos alcaloidais de cascas e folhas de *A. ramiflorum* apresentaram boa atividade contra a forma extracelular (promastigotas) de *Leishmania amazonensis* (CUNHA et al., 2012).

Alcaloides indólicos isolados de *A. marcgravianum* mostraram atividades antimicrobiana e citotóxica (VERPOORTE et al., 1982), enquanto os isolados das cascas das raízes de *A. excelsum* Benth apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (VERPOORTE et al., 1983). Diante destes dados, extratos de aspidospermas têm se mostrado promissores como potenciais antibacterianos e antiparasitários, por isso é imprescindível a realização de mais estudos de atividade biológica com estas plantas (OLIVEIRA et al., 2009).

As espécies amazônicas *A. nitidum* Benth. ex Müll. Arg. (1860) e *A. excelsum* Benth. (1841) foram consideradas como distintas nas revisões de Woodson (1951) e Bolzani (1987), esta autora agrupou as duas espécies na série Nitida, a qual se diferencia das demais pelo tipo esquelético do alcaloide indólico constituinte. Recentemente as duas foram sinonimizadas, constituindo uma única espécie, os autores da Flora do Brasil, Koch et al., (2012) e Tropicos- Home (2012) consideram *A. excelsum* como nome aceito e *A. nitidum* como sinônimo. Assim no presente trabalho será adotada a classificação atual.

A. excelsum Benth., espécie de interesse neste estudo, tem suas cascas indicadas para problemas estomacais e de indigestão, diabetes, inflamações do útero, ovário e do estômago, contra câncer e como contraceptivo (CHEVALIER, 1996; RIBEIRO et al., 1999). É também utilizada para o tratamento de malária por nativos de diferentes locais da região (BRANDÃO ET AL., 1992; MEJIA & RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Um estudo etnofarmacológico realizado em Igarapé Mirim (PA, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas da espécie para o tratamento de febre e malária (PINTO & BARBOSA, 2009). No Peru é utilizada por Índios Shipibo-Conibo, para o tratamento da hepatite e malária (MEJIA & RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002).

A. excelsum Benth. (Figura 2) é uma árvore de tamanho médio com o tronco trançado e canelado, que alcança posição no dossel superior. Sua casca é fina, dura, muito amarga e não exsuda látex quando cortada. Possui folhas simples, que estão arrançadas em espiral e tem superfície abaxial esbranquiçada. Os frutos do tipo folículo são deiscentes, duros e contêm sementes com asas circulares (PARROTA et al., 1995).

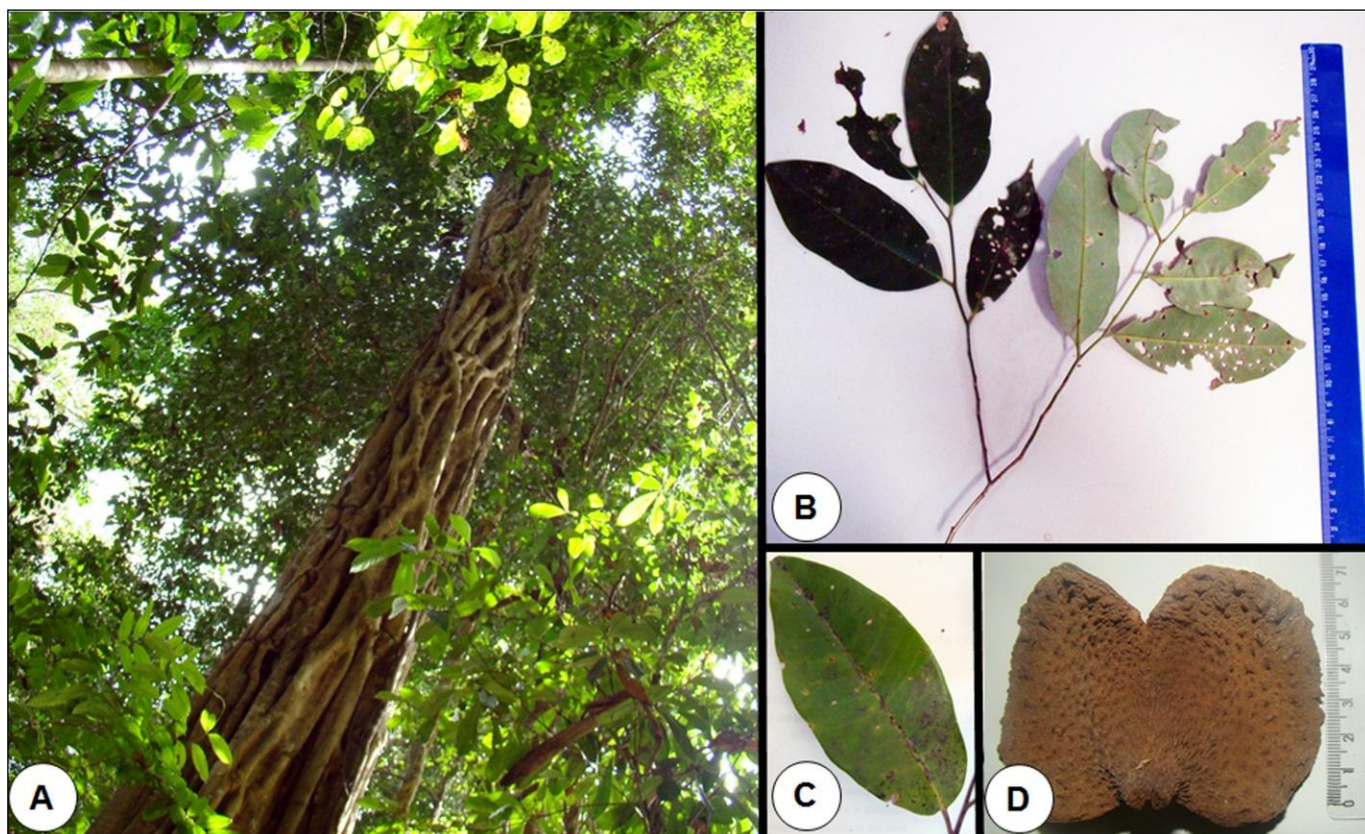


Figura 2: A. Indivíduo de *Aspidosperma excelsum* Benth. A: Tronco sulcado; B: Ramos foliares mostrando superfície adaxial e abaxial das folhas; C: Folha elíptica; D: Fruto do tipo folículo.

Segundo a revisão mais recente realizada por Pereira et al. (2007), são conhecidos 22 alcaloides indólicos (Figura 3).

De acordo com Perez (2002) apesar das várias indicações terapêuticas e de sua grande aplicação como poderoso agente antimalárico, poucas pesquisas biológicas têm sido conduzidas com esta espécie. Um dos únicos trabalhos realizados de cunho farmacológico foi o de Verpoorte et al. (1983) e Gomes (2011), este último mostrou atividade antiplasmódica boa a moderada dos extratos e frações de *A. excelsum* e o extrato hidroetanólico apresentou atividade esquizotóxica rápida, ativo nas primeiras 24 horas.

Segundo Barbosa (2003), as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são adequadas para análises visando o controle de qualidade de frações alcaloídica, como também para o isolamento dos alcaloides de *A. auriculatum*, espécie conhecida no Pará como carapanaúba, que é indicada popularmente para tratar febre e outras afecções, inclusive malária.

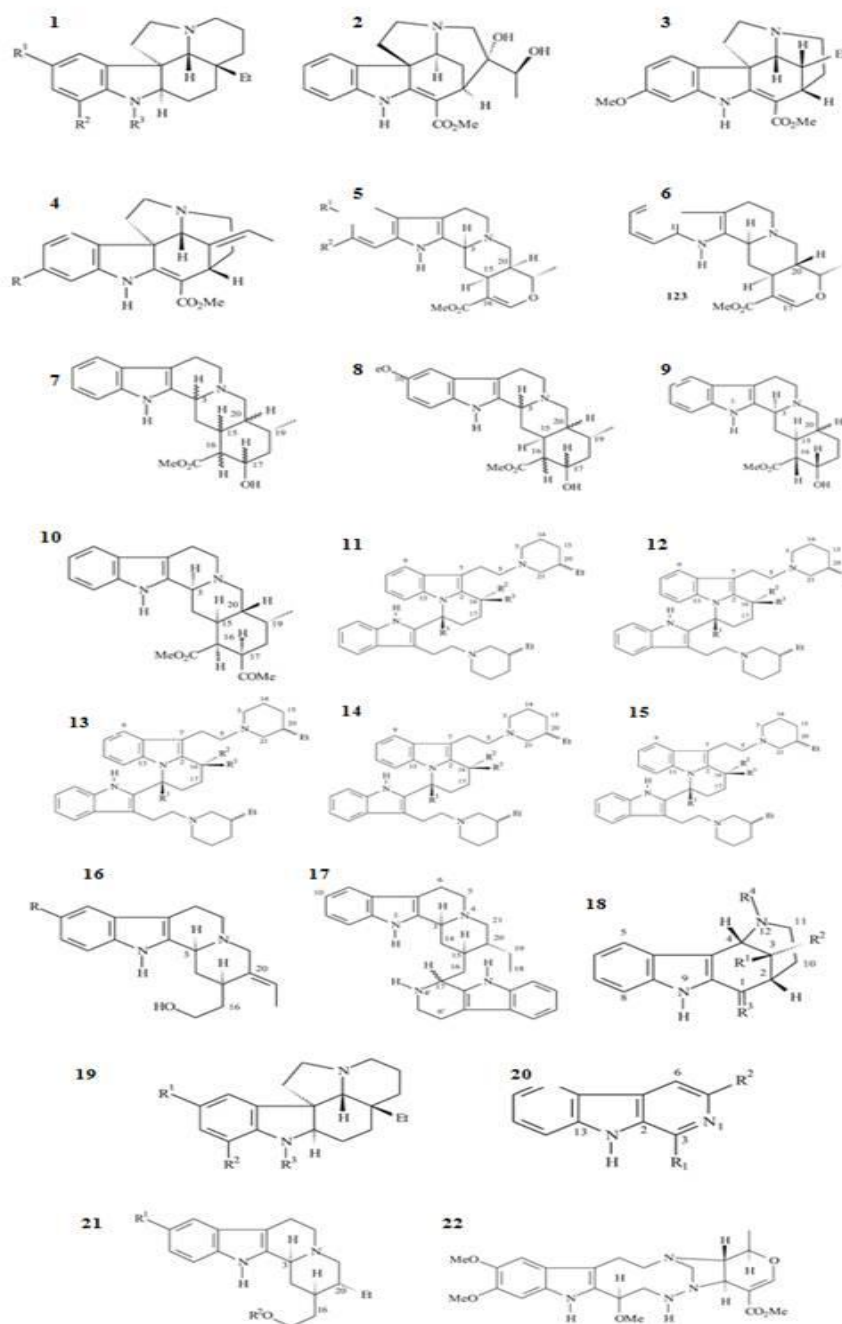


Figura 3: Alcaloides indólicos aislados de *Aspidosperma excelsum* 1. (+)-Des-O-metilaspidospermina; 2. Compactinervina; 3. Tubotaiwina; 4. 11-Metoxitubotaiwina; 5. 3 α -Aricina; 6. Ajmalicina; 7. Ioimbina; 8. Metoxicorinantina; 9. Quebrachina; 10. Acetilioimbina; 11. Didesmetoxicarboniltetraidro-secamina; 12. Tetraidro-secamina; 13. 16-Desmetoxicarboniltetraidro-Secamina; 14. 16-Hidroxitetraidro-secamina; 15. 16-Hidroxi,16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina; 16. 3 α -10-Metoxigeissoschizol; 17. 17(R)-Ocroliufanina; 18. Uleína; 19. N-Acetilaspidospermidina; 20. Ácido harmanocarboxílico; 21. 3 α ,20 β -10-Metoxi-18,19-diidro-Corinanteol; 22. Braznitidumina.

Estudos sobre screening fitoquímico de espécies utilizadas como fitoterápicos são a principal forma de realizar o controle de qualidade de drogas vegetais. Jácome et al. (2003) estudando a tintura de "pau-pereira" verificou que a mesma poderia ser produzida a partir de *A. parvifolium* ou *Geissospermum vellosii*. Porém as análises por CCD e CLAE mostraram que *A. parvifolium*, uma entre várias Apocynaceae, não é ingrediente da tintura uma vez que o alcalóide uleína, um marcador químico da espécie, não foi detectado no fitoterápico. Poderia se tratar de *G. vellosii*, que possui os alcaloides gessospermina, pereirina e velosina, mas o perfil cromatográfico da tintura obtido por CLAE sugeriu possuir principalmente polifenóis.

Investigações sobre a atividade biológica e toxicidade de plantas com constituintes químicos de importância farmacológica são imprescindíveis para amparar o uso comprovadamente terapêutico pelas populações tradicionais. Oliveira et al. (1988), identificaram uma complexa mistura de alcalóides composta por: olivacina, guatambuína, 3,14 – diidroolivacina em *A. nigricans*, porém sem relatos sobre atividades biológicas e nem toxicidade. *A. subincanum* Martius, conhecida popularmente como guatambu e com amplo uso popular em Goiás, foi investigada em termos de sua toxicidade e os estudos demonstraram que as doses superiores a 5000 mg/kg por via intra-peritoneal correspondentes não demonstraram dano fatal aos camundongos (GOLONI et al. 2005).

1.1.3. Metabólitos secundários e estruturas secretoras.

O metabolismo constitui um conjunto de reações químicas vitais, que tem como fim a produção de energia ou de compostos necessários para o sucesso evolutivo dos organismos, desta forma é comum a todos os seres vivos. E nas células vegetais pode ser de dois tipos: primário e secundário (SANTOS, 2001).

As vias necessárias para a sobrevivência das células vegetais são chamadas básicas ou metabolismo primário (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008). Todas as plantas sintetizam compostos primários para seu crescimento e desenvolvimento, que são indispensáveis em atividades como fotossíntese, respiração, diferenciação, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, síntese de carboidratos, proteínas e lipídios. Já os metabólitos secundários possuem distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, são compostos específicos limitados a grupo de espécies relacionadas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

No princípio eram considerados como resíduos, restos metabólicos, excrementos ou mesmo produtos sem função (DIXON, 2001). As substâncias que já não participam do metabolismo de uma célula vegetal são por vezes, referidas como excreção. Na planta, no entanto, nenhuma distinção nítida pode ser feita entre a excreção e secreção. Além disso, a função exata de muitos compostos secundários para a planta, ainda é desconhecida (EVERT, 2006).

Somente a partir do século XIX passaram a ser investigados por sua importância medicinal como venenos, aromatizantes e materiais industriais por serem comercializados e/ou utilizados pelo homem (GEISSMAN & CROUT, 1969; REYNOLDS, 2007). Sabe-se hoje, que tais compostos possuem grande utilidade para as plantas, agindo contra herbívoros e infecções por microorganismos patógenos, proteção contra raios ultravioletas, como alelopáticos, além de atraírem animais polinizadores e dispersores de sementes (WINK, 2003; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética. As três classes principais são: compostos fenólicos, terpenos e esteróides, e os alcaloides (HARBONE, 1999). Os flavonóides atuam no crescimento, desenvolvimento e defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON & HARRISON, 1990), e são importantes na dieta humana, atuando principalmente como anti-oxidantes (PIETA, 2000). Os alcaloides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (CORDELL, 1981). E os terpenos constituem o maior grupo de compostos secundários, são considerados tóxicos e deterrentes para insetos e mamíferos herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Estes compostos são produzidos e armazenados dentro de estruturas anatômicas de plantas, as quais são formadas por células, que podem estar individualizadas, a exemplo, os idioblastos, ou podem compor estruturas multicelulares de formas variadas, tais como: tricomas, emergências, cavidades ou bolsas, ductos ou canais, etc. Nas cavidades ou bolsas, o material é secretado em um espaço interno, o lume, o qual é isodiamétrico, enquanto nos ductos ou canais o espaço é alongado em um único plano (CASTRO & MACHADO, 2006).

As estruturas secretoras são divididas em duas categorias: externas e internas, nas primeiras o exsudato é liberado para fora das células, enquanto nas últimas o exsudato fica contido, mas pode ser liberado para o ambiente externo, quando a célula é injuriada. A secreção compreende complexos processos de formação, podendo incluir a síntese e isolamento de determinadas substâncias em compartimentos do protoplasto da célula secretora e posterior liberação para espaços intercelulares ou para a superfície externa do corpo do vegetal (CASTRO & MACHADO, 2006). As substâncias secretadas podem ser íons (removidos sob a forma de sais); assimilados excedentes (eliminados como açúcares) ou substâncias de células (produtos do metabolismo secundário), este último pode não ser útil ou parcialmente útil fisiologicamente (alcaloides, taninos, óleos essenciais, resinas, cristais), substâncias que tem função especial na fisiologia vegetal (enzimas, hormônios) ou ainda, substâncias, que são fundamentais na interação planta-meio ambiente (EVERT, 2006).

O estudo das estruturas secretoras pode ser feito de três formas, através de investigação anatômica da estrutura vegetal, da análise histoquímica e fitoquímica do exsudato, que mostra a presença e/ou intensidade das principais classes de compostos *in situ* e identificam as substâncias

respectivamente. É importante relacionar a função destas estruturas e substâncias com o contexto ecológico/evolutivo, que a planta está inserida.

Em Apocynaceae, as estruturas secretoras são encontradas tanto nos órgãos vegetativos quanto nos reprodutivos e as mais relatadas são: coléteres, epiderme da cabeça dos estiletos, nectários, laticíferos, osmóforos, cavidades, idioblastos e tricomas (METCALFE & CHALK, 1950; 1979; ENDRESS & BRUYNS, 2000; SIMÕES, 2004; DEMARCO, 2005; SIMÕES et al., 2006).

Apocynaceae acumula muitos metabólitos secundários, sobretudo alcaloides. Do gênero *Aspidosperma* já foram isolados cerca de 250 alcaloides indólicos (BOLZANI et al., 1987; JACOME, 1998; PEREIRA et al., 2007). Tais alcaloides indólicos apresentam considerável diversidade estrutural, a maioria contendo o esqueleto β -carbólico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980). A marcação isotópica de precursores indica que a parte indólica desses alcaloides é derivada biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de carboidratos, pela via chiquimato (WENKERT, 1965).

1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIPINO, D. G.; LIMA M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.; MORENO, P.; YOUNG, M. C. M.; MORENO, P. R. H. Screening of brazilian plants for antimicrobial and dna-damaging activities. I. Atlantic Rain Forest-Ecological Station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**. v. 4, p. 1-15. 2004.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia Brasileira (Apocynaceae): *Aspidosperma carapanauba* Pichon, *A. marcgravianum* Woodson e *A. oblongum* A. DC. **Acta Amazônica**. v.1, p. 9-20. 1971.
- ALBUQUERQUE, U. P. & HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, p. 678-689. 2006
- ALLEN, J. R. F. & HOLMSTEDT, B. R. "The Simple β -Carboline alkaloids". **Phytochemistry**. v.19, p. 1573-1582. 1980.
- ALLORGE, L.; POUPAT, C. Position systématique et révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trois Guyanes. Le point sur leur chimie. **Letters Botaniques**. v.138, p.267-301. 1991.
- AÑEZ, R. B. S. **Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica**. Manaus, 55p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 2009.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.161, p.105-121. 2009.

- BALICK, M. J. & COX, P. A. **Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany**. New York: Scientific American Library. 1997.
- BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C.; SOARES, D. C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 6-8. 2003.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASSO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F. & LIMA, H. C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV. v.3, p.326. 1991.
- BARTLING, F. G. **Ordines naturales plantarum corumque characteres et affinitates**. Gottingen: Dieterich. 1830.
- BENOIT, G. A.; LYON R. L.; FONG H. H. S.; FARNSWORTH N. R. Biological and phytochemical evaluation of plants XIII: Preliminary estimation of analgesic activity of rhazinilam, a novel alkaloid isolated from *Aspidosperma quebracho-blanco* leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.62. 1889.
- BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole alkaloids evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**. Fortaleza-CE. v.15, p.187-200, 1987.
- BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER D. R.; KRETTLI A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. Belo horizonte. v. 36, p. 175-182. 1992.
- CASTRO, M. M. & MACHADO, S. R. **Células e tecidos secretores**. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Anatomia Vegetal. Viçosa: Ed. UFV. 2006.
- CHEVALIER. A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. Dorling Kindersley: London. 1996.
- CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach**. Nova York: John-Wiley & Sons, p. 208. 1981.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro. 1931.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University, Nueva York, U.S.A. 1981
- CUNHA, A. C.; CHIERRITO, T. P.; MACHADO, G. M.; LEON, L. L.; DA SILVA, C. C.; TANAKA, J. C.; DE SOUZA, L. M.; GONÇALVES, R. A.; DE OLIVEIRA, A. J. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**. Maringá. v.19, p. 413-417. 2012.
- DASTOOR, N. J.; GORMAN, A. A.; Schmid H. Über die Alkaloide von *Aspidosperma discolor* A. DC. **Helvetica Chimica Acta**. Zikich. v. 50, p. 213-231, 1967.
- DE CANDOLLE, A. **Prodromus Systemati Naturalis Regni Vegetabilis**, Paris. 1844.
- DEMARCO, D. **Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae s.l.)**. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.
- DI STASI, L. C. & HIRUMA-LIMA, C. A.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gentianales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP. 2002.

- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**. Oklahoma. v.411, p. 843–847. 2001.
- DIXON, R. A. & HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**. v. 28, p. 165-234. 1990
- DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; PERES, J. M.; NASCIMENTO, J. M. S.; PÓVO, M. M.; OLIVEIRA, A. B. In vitro antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Belém- PA. v.84, p. 899-910. 2012.
- ENDRESS M. E. & BRUYNS P. V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. **Botanical Review**. New York. v. 66, p. 1-56. 2000.
- ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S. & MEVE, U. Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 2007.
- ENDRESS, P. K. Structure and relationships of basal relictual angiosperms. **Australian Systematic Botany**. 2004.
- EVERT, R. F. 2006. **Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: Their structure, function, and development**. Ray F. Evert. 3rd ed. Rev. ed. of: Plant anatomy / Katherine Esau. 2ed.
- GEISSMAN, T. A. & CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. California, Freeman, Cooper & Company, 592p. 1969.
- GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 38, p. 315-319. 1966.
- GOLONI, R.; ALVES, N. M.; GARROTE, C. F. D.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* Martius. v.2, p. 89-91. 2005.
- GOMES, L. F. S. **Abordagem Fitoquímica, determinação da atividade antiplasmodica in vitro e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. 2011.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. Londres: Chapman & Hall. p.288. 1984.
- JÁCOME, R. L. R. P. **Estudo químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parviflorum* A. DC. - Quantificação por CLAE de naftoquinonas isoladas de *Z. montana***. Belo Horizonte. (Tese) Doutorado em Química. Universidade Federal de Minas Gerais. 1988.
- JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A., OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 39-41. 2003.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, p. 777 1993.
- JUDD, W. S.; SANDERS, R. W. & DONOGHUE, M. J. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analysis. **Harvard Papers in Botany**. v.5, p. 1-51. 1994.

- JUSSIEU, A. L. Genera plantarum secundum ordines naturales disposita. Paris: Herissant et Barrois. 1789.
- KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L. S.; SIMÕES, A. O.; SPINA, A. P. **Apocynaceae** in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33616>>. Acesso em: 10 Dez. 2012.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre. 2007.
- LINDLEY, J. **Nixus Plantarum**. Ridgway & Sons, London, UK. 1833.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum. 1998.
- LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H.; Biological and phitochemical avaluation of plants. XI. Isolation of aspidospermine, quebrachamine, rhazinilam, pyriifolidine and akuammidine form *Aspidosperma quebracho*-blanco (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 62, p. 218. 1973.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. V.23, p. 429-438. 2002.
- MARCONDES-FERREIRA, W. **Aspidosperma Mart. Nom. cons. (Apocynaceae) estudos taxonômicos**. Campinas. 1988. (Tese) Doutorado em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas.
- MARTINS, M. T. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e de atividades biológicas de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. 2012.
- MARTIUS, C. F. P. & ZUCCARINI. Nova Genera Et Species Plantarum Brasiliensium, p. 61. 1824.
- MEJIA, K.; RENGIFO, E. **Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana**. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa. 2000.
- MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L. P. J. E; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. v.110, p.165-70, 2007.
- METCALFE, C. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, 1950.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Claredon. 1979.
- MEVE, U. Species numbers and progress in asclepiad taxonomy. **Kew Bull**. v.57, p. 459-464. 2002.
- MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**. New York. v. 3, p. 212-237. 1997.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia. **Horticultura Brasileira**. Botucatu. v.12, p. 9-13. 1994.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. **MMA/SBF**. Brasília. 404 p. 2002.

NUNES, D. S.; KOIKE, L.; TAVEIRA, J. J.; Reis, F. A. M. Indole alkaloids from *Asperdosperma pruinosum*. **Phytochemistry**. Campinas. v. 31, p. 2507-2511. 1992.

OBITZ, P.; STÖCKIGT, J.; MENDOZ, L. A. Alkaloids from Cell Cultures of *Aspidosperma quebracho-blanco*. **Academic Press**, London, UK. 1997.

OLIVEIRA, L. C. S.; CATANHO, M. T. J.; DEMELO, A. A.; CASADO, M. M. C. W.; DA SILVA, D.E.; DA SILVA, N. H. Caracterização de atividades farmacológicas da olivacina em *Aspidosperma nigricans*. Congresso Nacional de Botânica, Belém, 1988.

OLIVEIRA, F.Q; JUNQUEIRA, R.G; STEHMANN, J.R.; BRANDAO, M.G.L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Belo horizonte. v.5, p. 23-31. 2003.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, p. 92-99. 2009.

PARROTA, J. A.; FRANCIS, J. K.; ALMEIDA, R. R. **Trees of the Tapajós: a photographic field guide**. (General technical report - IITF). United States: Department of Agriculture/ International Institute of Tropical Forestry, 1995.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Manaus. v. 8, p.1-8, 2006.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**. v. 30, p.970-983, 2007.

PEREZ, D. Etnobotânica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. **Folia Amazónica**. Peru. v.13, p. 87-108, 2002.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, L. N. & BARBOSA, W. L. R. **Etnofarmácia do município de Igarapé Miri- PA**. In: BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; SILVA, W. B. S.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O. In: Etnofarmácia: Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica. 2009.

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae Adans. na reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisas Botânicas**. v.56, p. 13-74. 2005.

RAPINI, A. Asclepiadaceae ou Asclepiadoideae (Apocynaceae)? Conceitos distintos de agrupamento taxonômico. **Hoehnea**. v. 27 p. 121-130, 2000.

RAPINI, A. Apocynaceae (dogbane and milkweed family). In: SMITH, N. et al. (Ed.). **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press. 2004.

- RAPINI, A. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguésia**. Feira de Santana. v.63. 2012.
- REIS, A. R. S. **Anatomia foliar e o xilema secundário de espécies de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae)**. Dissertação de Mestrado em Botânica Tropical, Universidade Federal Rural da Amazônia. 2008
- REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**. Richmond. v. 68, p. 2887-2895. 2007.
- RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, L. C. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. 19. ed. Manaus: Midas Printing, 1999.
- RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. São Paulo: E. Blücher, 1971.
- RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1976.
- ROBERT, G. M. T. Analyse structural d'alcaloides isolés de deux especes guyanaises de *Aspidosperma*: *A. margravianum*, *A. oblongum* (Apocynaceae). **Syn**. 1982.
- SANTOS, R. I. 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. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. 2001.
- SANTOS, M. C. A.; FREITAS, S. P.; AROUCHA, E. M. M.; SANTOS, A. L. A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 2009.
- SCHMUTZ, J.; HUNZIKER, F.; HIRT, R. Ulein das Hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mgf. *Aspidosperma*-Alkaloide, 1. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta*. v. 57, p. 1189-1200, 1957.
- SENNBLAD, B., BREMER, B. The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with rbcL data. **Plant Systematics and Evolution**. v. 202, p. 153-175. 1996.
- SENNBLAD, B., BREMER, B. Is there a justification for differential a priori weighting in coding sequences? A case study from rbcL and Apocynaceae. **Systematic Biology**. v.49, p. 43-55. 2000.
- SIMÕES, J. C.; GILBERT, B.; CRETNEY, W. J.; HEARN, M.; KUTNEY, J. P. ALKALOIDS OF ASPIDOSPERMA-CUSPA - 16-EPI-ISOSITSIRIKINE, A NEW INDOLE BASE. **Phytochemistry**. v.15, p.543-4. 1976
- SIMÕES, A.O. **Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae)**. Tese (Doutorado - Biologia Vegetal) - Departamento de Botânica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.
- SIMÕES, A.O.; CASTRO, M.M.; Kinoshita, L.S. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 387-398, 2006.
- SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII**. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 768p, 2012.

STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. Cladistics and family level classification of the Gentianales. **Cladistics**. v.10, p. 175-206. 1994.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THORNE. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. **Aliso**. v.13, p.365-389. 1992.

TROPICOS.ORG. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. <http://www.tropicos.org/Name/1800114>> Acesso em: 17 Mai. 2013.

VERPOORTE, R.; PUIGROK, C. L. M.; BERARHEIM, S. A. Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, v.46, p.149-52, 1982.

VERPOORTE, R.; KOS-KUIJCK, E.; TJIN. A.; TSOI, A.; RUIGROK, C. L. M.; JONG, G. Medicinal plants of Surinam.III: antimicrobially active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**. v. 48, p.283-289. 1983.

VIEIRA, M. N. **Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba (*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de Oriximiná – PA**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2011.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton: CRC Press. 2008.

WENKERT, E. & WICKBERG, B. Additions and Corrections- General Methods of Synthesis of Indole Alkaloids. IV. A Synthesis of dl-Eburnamonine. **Journal of the American Chemical Society**. v.87, p. 5810–5810. 1965.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. Heidelberg. v.64, p. 3–19. 2003.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, p. 119-206, 1951.

Capítulo 1

MARCADORES FARMACOGNÓSTICOS ÀS FOLHAS DE *Aspidosperma excelsum* BENTH (APOCYNACEAE).

Rafaela Cabral S. Trindade^{*,1,2}, Márlia R. Coelho-Ferreira^{*,2}.

¹*Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil,*

²*Coordenação de Botânica, Museu Paraense Emílio Goeldi, Brasil,*

* Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia.

(*) Autores para correspondência: rafa.bio@hotmail.com; mcoelho@museu-goeldi.br

Abstract: *Aspidosperma excelsum* Benth. is an amazonic specie, traditionally known as carapanauba, wich barks are frequently used for preparing domestic medicines to fight liver diseases, fever and malaria. Nevertheless, a large part of the existing studies refers about the chemical components present in barks, with incipient records about the existence and concentration of these in other plant organs. The focus of this study was to characterize the leaf anatomy, focusing on local production and / or accumulation of biologically active compounds, as well as the phytochemical profile of *A. excelsum* leaves. Some leaves samples were collected from Santa Barbara's county, fixed and processed according to the usual techniques in plant anatomy. For phytochemical research, previous analyzes were performed as particle size of the dust and total ashes, followed by the techniques of Thin-Layer Chromatography and High-Efficiency. The anatomical study showed that the adaxial and abaxial surface's leaf exhibit heterodimensionais cells, covered by a thick and striated cuticle, with ornaments restricted to the abaxial surface. Unicellular tector trhicoms of two types occur on both sides, one is tapered with smooth wall, located just on the midrib and the other with ornate wall observed between the midrib and the margin. The margin is revolute, the mesophyll is dorsiventral and displays three types of sclereids: osteo, astro and columnar. The midrib is plano-convex, with bicolaterais bundles. The petiole is plano-convex with brachy and macrosclereids exclusive to the fundamental parenchyma. Laticifers and idioblasts are major secretory structures found in leaves. Histochemical tests in the secreted these structures revealed a mixed composition, consisting of phenolic compounds, tannins, alkaloids and total lipids. The phytochemical screening confirmed the presence of these compounds, in addition to flavonics glycosides and steroids. Alkaloids were detected only in the selective extraction, demonstrating that find themselves in low content of in the *A. excelsum* leafs. These data could justify the using of the barks by the local population, to the detriment of the leaves, however it must be considered as a target for bioprospecting by pharmaceutical industry.

Keywords: alkaloids, Amazônia, carapanauba, laticifers.

Introdução

Apocynaceae *s.l* possui aproximadamente 5.100 espécies encontradas em todos os continentes exceto na Antártica (Rapini, 2004). Apresenta ampla aplicação, sobretudo medicinal, devido à presença de metabólitos bioativos no látex, *e.g.* glicosídeos, borracha, triterpenos, ácidos graxos, fitoesteróis e alcaloides (Metcalf & Chalk, 1950; Yoder & Mahlberg, 1976). Tal fato tem colocado a família em foco quanto aos estudos científicos, visando à descoberta de novas drogas vegetais (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

Aspidosperma Mart. & Zucc. é um dos gêneros mais investigados em termos de alcalóides, substância encontrada geralmente nos laticíferos (Yoder & Mahlberg, 1976; Bolzani, 1987; Pereira, 2007). O tipo de laticífero mais descrito na literatura clássica para Apocynaceae é o não-articulado (Solereder, 1908; Metcalfe, 1967), porém Demarco et al., (2006) evidenciaram a ocorrência de laticíferos articulados anastomosados em *A. australe* Müll. Arg. e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn..

Aspidosperma excelsum Benth., (sinonímia *Aspidosperma nitidum* Benth.) espécie de interesse nesta investigação, é conhecida tradicionalmente como carapanaúba na região Amazônica, onde suas cascas são frequentemente usadas no preparo de remédios caseiros para o tratamento de doenças hepáticas, febre e especialmente malária (Milliken, 1997). É importante ressaltar que a coleta extensiva deste tecido poderia comprometer a conservação da espécie.

Sabe-se que já foram isolados 22 alcaloides indólicos de *A. excelsum* (Pereira, 2007) e que os extratos etanólicos da planta apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Plasmodium falciparum* (Verpoorte et al., 1983; Gomes, 2011; Martins, 2012).

Añez (2009) ressalta que apesar das folhas não serem mencionadas como medicinal, devem ser investigadas, pois são abundantes e trazem consigo componentes ativos similares e distintos daqueles encontrados na casca, sugerindo a bioprospecção das folhas pela indústria.

Estudos anatômicos são imprescindíveis porque permitem localizar as estruturas secretoras *in situ*, seu desenvolvimento e fornecem subsídios para o controle de qualidade de drogas vegetais (Akisue & Oliveira, 1987; Ming, 1994). O *screening* fitoquímico, também, é um recurso indispensável no estudo de plantas medicinais, pois proporcionam verificar as principais classes de metabólitos bioativos e auxiliam no controle de qualidade das drogas vegetais (Barbosa et al., 2003).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar anatômica e fitoquimicamente as folhas de *A. excelsum*., realizar a histoquímica das estruturas secretoras/armazenadoras e analisar física, físico-química e fitoquimicamente o pó de suas folhas, visando contribuir com os parâmetros de autenticidade e qualidade das folhas desta espécie.

Material e métodos

Material botânico

O material botânico foi coletado em Genipauá, localidade de Santa Bárbara do Pará (S 01° 10' 946' W 048° 11' 715') em maio de 2013 (Figura 1). A área de coleta constitui um ambiente de várzea, sendo periodicamente inundada. Uma amostra fértil de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae) foi herborizada e incorporada ao Herbário MG do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob registro MG206608. A identificação da espécie foi confirmada pelo Dr. Washington Marcondes Ferreira-Neto (Herbário UEC/Unicamp).

Para as análises físicas, físico-químicas, fitoquímicas, cerca 1 Kg de folhas foram higienizadas, secas em estufa de ar quente a 40 °C e trituradas em moinho de facas de aço inoxidável. O pó obtido foi armazenado em frascos hermeticamente fechados.



Figura 1: Área de coleta de *A. excelsum*. Fonte: (<http://www.google.com/earth/>)

Análises anatômica e histoquímica

Para as análises anatômica e histoquímica, foram utilizadas as regiões medianas da lâmina foliar e pecíolo, cortadas com uma lâmina pré-aquecida para manter a integridade das estruturas secretoras internas (Milanez, 1960). As amostras foram fixadas em FAA₇₀ (Johansen, 1940) e FNT (Lillie, 1948). O material foi desidratado em série butílica (Johansen, 1940) e incluído em parafina histológica e 2-hidroxietil-metacrilato (Historesin Leica), segundo especificações do fabricante. Secções transversais, longitudinais e paradérmicas (12-18 µm de espessura) foram realizadas em micrótomo de avanço automático (Leica® RM 2245, Nussloch, Alemanha), coradas com safranina/azul de astra (Gerlach, 1969), azul de toluidina (O'Brien, 1964) e tripla coloração de Flemming (Johansen, 1940) e montadas em resina sintética (Permout® , New Jersey, USA).

Para dissociação da epiderme da lâmina foliar, amostras foram submetidas ao hipoclorito de sódio em concentração de 2% (Johansen, 1940). A maceração foi feita segundo Franklin (1945).

Para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (Johansen, 1940), secas em ponto crítico de CO₂ (Bozzola & Russel, 1991), montadas em suportes metálicos (stubs) e metalizadas em ouro. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP.

Os testes histoquímicos foram realizados em secções da nervura central e pecíolo. Amostras fixadas em FAA foram destinadas aos testes para compostos hidrofílicos e em FNT para lipofílicos, estas foram incluídas em paraplast (Kraus & Arduin, 1997). As classes de metabólitos secundários foram investigadas com os seguintes testes e respectivos controles realizados simultaneamente: Sudam Black B (Pearse, 1985), Sulfato azul do Nilo (Cain, 1947), Acetato de cobre/Ácido rubeânico (Ganter & Jollés, 1969, 1970), Reagente de NADI (David & Carde, 1964), Cloreto férrico (Johansen, 1940), Reagente de Dragendorff (Svedsen & Verpoorte, 1983), Ácido tânico/Cloreto férrico (Pizzolato & Lillie, 1973), Vanilina clorídrica (Mace e Howell, 1974), Lugol (Johansen, 1940) e Ác. sulfúrico (Kraus & Arduin, 1997) . As fotomicrografias foram obtidas em câmara digital Cannon modelo A65015, acoplada em microscópio Zeiss modelo 426126.

As nomenclaturas estruturais foram baseadas em Metcalfe & Chalk (1950) e Potiguara et al. (2013).

Análises físicas, físico-químicas e fitoquímicas

Determinação da distribuição granulométrica

Amostras de 25g do pó foram submetidas a agitação em tamises com abertura de malha decrescente. O procedimento foi realizado em triplicata durante 15min cada. A classificação e tamanho das partículas foram avaliados pela quantificação percentual de retenção do pó, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) e pelo índice de Sauter, utilizando a fórmula:

$$dps = [\sum (x_i/d_{pi})]^{-1}$$

onde: x_i - fração de massa retida

d_{pi} - diâmetro de abertura da peneira n.

Determinação do teor de cinzas totais

Três gramas do pó foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e tarados. As amostras foram carbonizadas em mufla em até 600°C por 3 h. Após resfriamento em dessecador sob vácuo, as mesmas foram pesadas em balança analítica. Este procedimento foi realizado em triplicata visando à obtenção de peso constante. A percentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca.

Obtenção dos extratos e frações

A extração de metabólitos secundários da folha foi realizada segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), através de percolação exaustiva, utilizando 1Kg de pó para 1L de álcool etílico 92,8°GL. O extrato etanólico foi concentrado até resíduo em Evaporador Rotativo (modelo Q344B1 QUIMIS®) equipado com bomba Hidro Vácuo (modelo Q355A2 QUIMIS®) em temperatura média de 60° C. O material foi armazenado em frascos, mantidos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A partir do extrato etanólico obtido das folhas de *A. excelsum* foram preparadas frações com solventes de polaridades crescentes: Diclorometano (DCM), Acetato de Etila (AcOEt) e Metanol (MeOH). Para confirmar a presença de alcaloides, foram feitas extrações seletivas ácido-básicas com DCM, sendo o pó tratado previamente com HCl 37% e NH₄OH 100%, ao final os extratos foram concentrados até resíduo.

Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

Na prospecção fitoquímica por CCD utilizaram-se extratos brutos (1 mg/mL, em MeOH) e cromatoplasas de alumínio recobertas por sílica gel 60G F254 Merck, visando detectar a presença dos seguintes grupos de metabólitos: cumarinas, geninas antracênicas e naftoquinônicas, heterosídeos antracênicos, triterpenos/esteróides, saponinas, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, taninos e polifenóis. Para cada grupo foi utilizado

um sistema eluente adequado, reveladores específicos e amostras de referência (Wagner & Bladt, 1984).

Obtenção dos perfis cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Esta técnica foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da UFMG. O extrato bruto foi solubilizado em MeOH grau (10 mg/mL) e centrifugado (10.000 rpm, 10 min.), sendo o sobrenadante utilizado. As análises foram realizadas em cromatógrafo 1 *Waters Alliance 2695 Separations Module* (equipado com bomba quaternária e autoinjetores). Foi Empregado e coluna C18 LiChrospher 100 (12,5 x 4 mm, 5 µm), fluxo de 1,5 mL/min, detecção UV 220-400 nm e eluição linear com (H₂O 0,1% H₃PO₄ - Acetonitrila), mantendo-se, em seguida, um curto período de eluição isocrática.

Resultados

Análises anatômica e histoquímica

A epiderme das faces adaxial e abaxial da lâmina foliar, em vista frontal, possui células com paredes anticlinais retas a ligeiramente sinuosas, cobertas por cutícula estriada e ornamentada respectivamente, com cera epicuticular em placas na face adaxial e em projeções na face abaxial (Figura 2A, B, C, D, E). As folhas são hipoestomáticas, com estômatos anomocíticos envoltos pela cutícula em projeções (Figura 2D, F). Dois morfotipos de tricomas tectores simples com indumento granuloso foram observados em ambas às faces da lâmina foliar. Um longo com o ápice afilado, que ocorre apenas sobre a nervura central da face abaxial e outro curto com ápice obtuso, que ocorre disperso por sobre a lâmina foliar de ambas as faces (Figura 2G, H). As células epidérmicas que cerceiam as bases dos tricomas são alongadas radialmente e dispostas em roseta (Figura 2D).

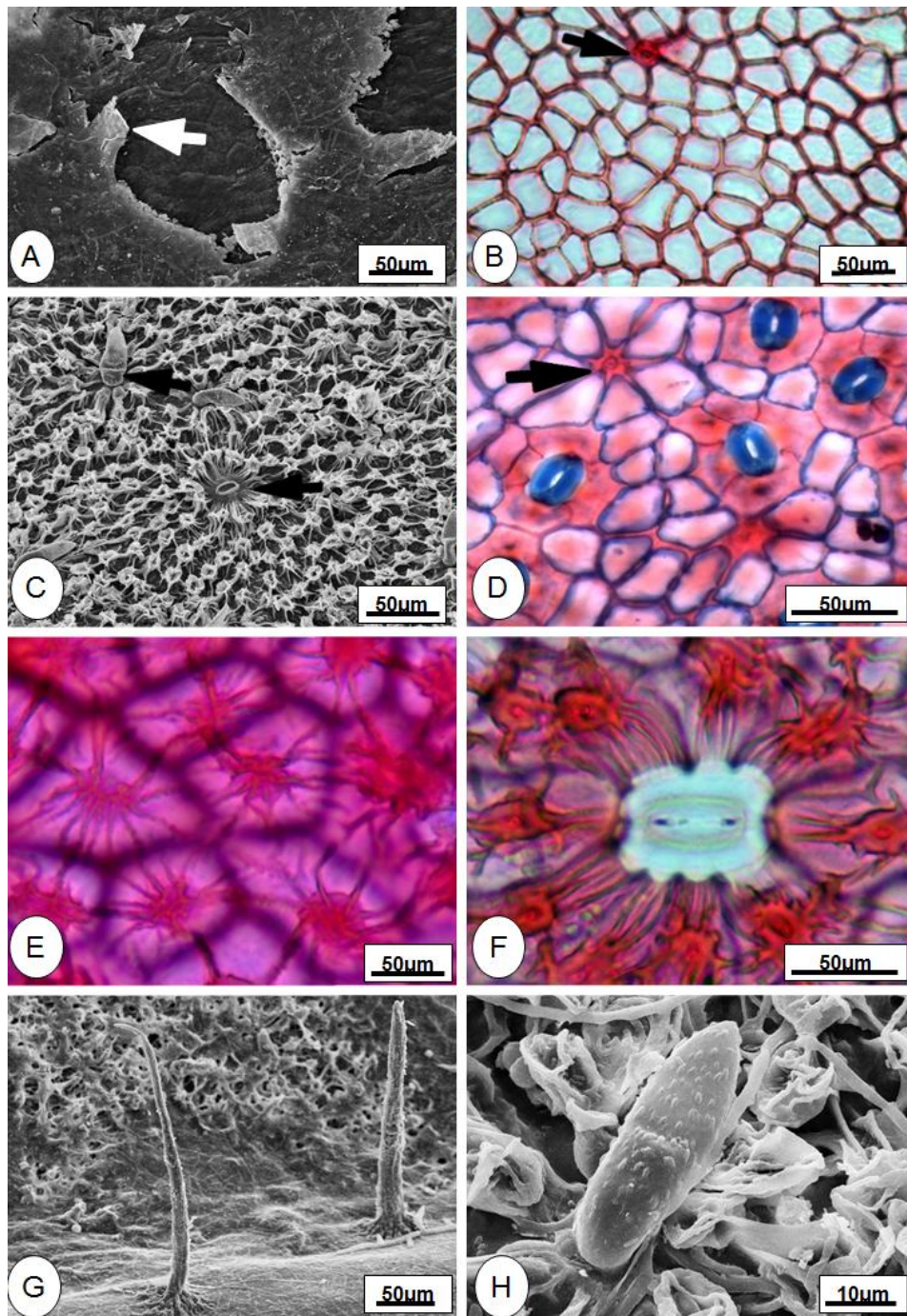


Figura 2: Vista superficial da lâmina foliar de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae). A; C; G e H: Eletromicrografias. B; D; E e F: Fotomicrografias. A; B. Superfície adaxial. C; D; E; F; G e H. Superfície abaxial. A: Detalhe da cutícula lisa e cera epicuticular em placa B: Detalhe da epiderme adaxial, notar base de tricoma (seta). C: Cera epicuticular em projeções, notar tricomas e estômatos (setas). D: Detalhe da epiderme, evidenciando estômatos anomocíticos e base de tricoma cercado por células dispostas em roseta (seta). E: Ornamentação cuticular. F: Estômato cercado por cutícula. G e H. Tricomas tectores longo de ápice afilado (G) e curto de ápice obtuso (H).

A lâmina foliar em secção transversal apresenta epiderme uniestratificada em ambas às faces, com células heterodimensionais de aspecto variado (Figura 3A). O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliádico constituído por uma camada e o esponjoso por seis a oito. A vascularização consiste de feixes colaterais envoltos por endoderme com cristais prismáticos, ocorrendo fibras no pólo xilemático. Esclereídes colunares e macroesclereídes são abundantes e atravessam o mesofilo (Figura 3A, B, C, D).

A nervura central, em secção transversal, apresenta formato plano-convexo. A epiderme possui as mesmas características descritas para a lâmina foliar (Figura 3E). Adjacente à epiderme abaxial são observadas camadas de colênquima (Figura 3F). O preenchimento é parenquimático, no qual ocorrem dispersos braquiesclereídes de tamanho notável. A vascularização consiste de feixes bicolaterais que seguem o formato da nervura (Figuras 3E, F).

A margem foliar, em secção transversal, é revoluta. As células epidérmicas são heterodimensionais, alongadas radialmente e cobertas por cutícula lisa e espessa assemelhando-se a papilas. O mesofilo dorsiventral gradativamente torna-se indiferenciado. A vascularização é feita por feixes colaterais semelhantes aos descritos para o mesofilo (Figura 3G).

O pecíolo possui formato plano-convexo com proeminências discretas latero-laterais voltadas para a face adaxial. Macro e braquiesclereídes ocorrem isolados ou agrupados no córtex parenquimático e células com conteúdo denso dispõem-se próximo a epiderme. A vascularização é feita por feixes bicolaterais que seguem o formato do pecíolo (Figura 3H, I, J).

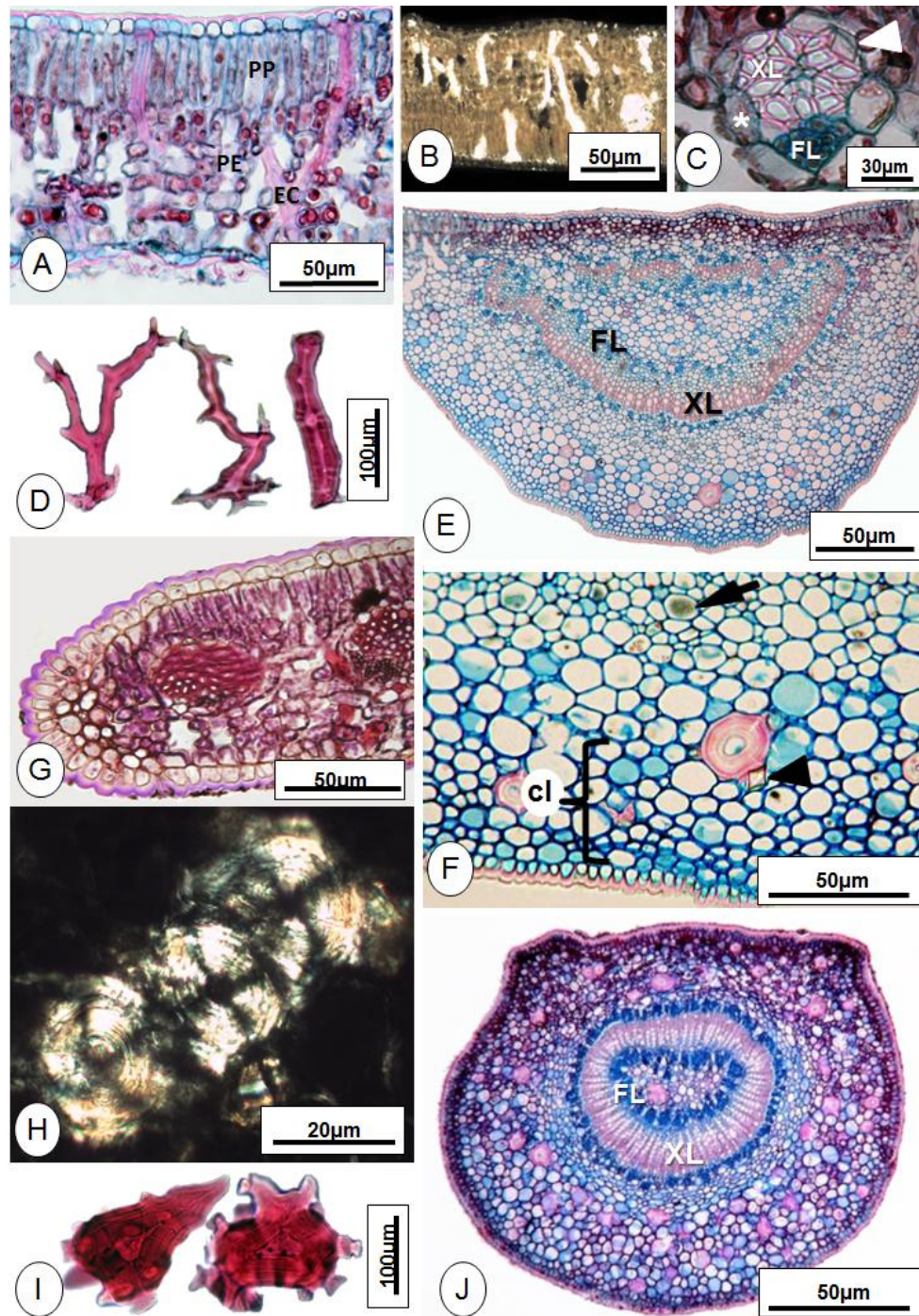


Figura 3: Secções transversais e macerado das folhas *Aspidosperma excelsum*. A, B, C, D: Mesofilo. E, F: Nervura central. G: Margem. H, I, J: Pecíolo. A: Vista geral. B: Vista geral sob luz polarizada. C: Feixe vascular, notar cristal prismático (cabeça de seta) e bainha parenquimática (asterisco). D: Esclereídes colunares e macroesclereídes. E: vista geral. F: Detalhe, notar laticífero (seta), esclereíde e cristal prismático (cabeça de seta) e colênquima (chave). G: Margem com feixe colateral. H e I: Esclereídes do pecíolo. J: Vista geral pecíolo. Parênquima paliçádico (PP), esponjoso (PE); xilema (XL) e floema (FL).

Estruturas secretoras

Os idioblastos secretores estão dispersos principalmente no parênquima fundamental da nervura central e no pecíolo, neste encontram-se adjacente aos feixes vasculares e abaixo da epiderme, dispõem-se em camadas e apresentam conteúdo acidófilo, corando intensamente com safranina (Figura 4A, C). Os idioblastos cristalíferos possuem cristais prismáticos de oxalato de cálcio e cristais mistos, localizam-se no córtex parenquimático da nervura central e pecíolo (Figura 4A).

A injúria das folhas ocasionou extravasamento de látex com coloração esbranquiçada e aspecto leitoso, que coagula em poucos segundos (observações em campo). Laticíferos simples foram observados adjacentes aos feixes vasculares do mesofilo, nervura central e pecíolo (Figura 4B, D). No mesofilo, a partir de secções paradérmica, foram encontrados laticíferos articulados ramificados (Figura 4E, F). Ambos os tipos de laticíferos possuem ductos alongados, são constituídos por parede primária e apresentam crescimento intrusivo entre as células parenquimáticas e esclereídes.

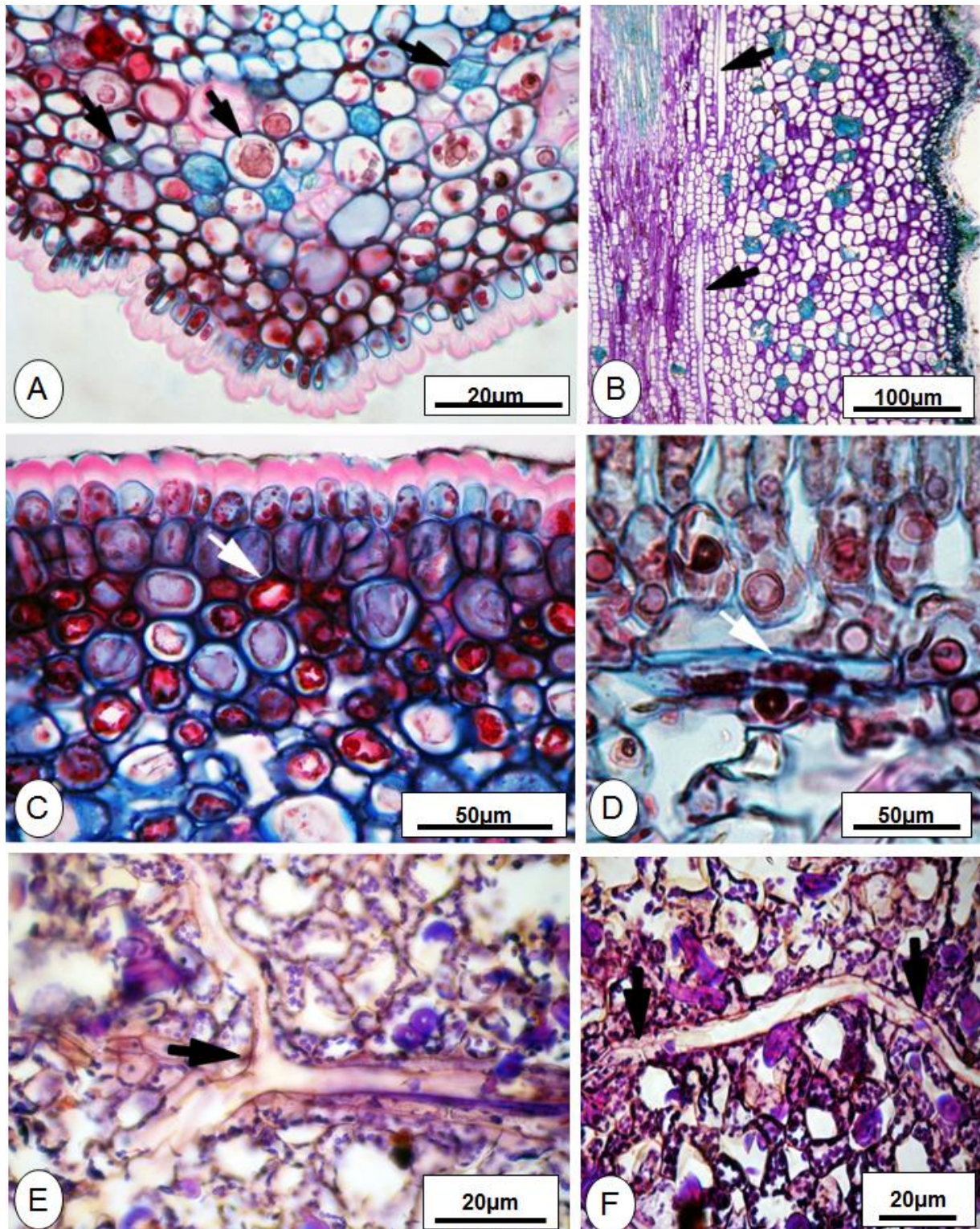


Figura 4: Estruturas secretoras das folhas de *Aspidosperma excelsum*. A, C, D: Secção transversal; B: Secção longitudinal; E, F: Secção paradérmica. A, C: Idioblastos no córtex da nervura central e pecíolo (seta) e idioblastos cristalíferos na nervura central (seta); B: Laticíferos próximos aos feixes vasculares do pecíolo. D, E, F: Laticífero no mesófilo notar conteúdo, ramificação e articulação (seta).

Quanto a histoquímica foi possível detectar vários metabólitos, sobretudo nos idioblastos; entretanto, não foi possível observar tais substâncias nos laticíferos (Tabela 1).

Tabela 1: Testes histoquímicos das folhas de *A. excelsum*.

Metabólitos		Testes	Idioblastos
Polissacarídeos	Mucilagem	Ácido tânico/Cloreto férrico	-
	Amido	Lugol	-
Alcaloides		Dragendorff	+
Compostos fenólicos totais		Cloreto férrico 10%	+
Taninos		Vanilina clorídrica	-
Flavonoides		Cloreto de alumínio	ND
Proteínas totais		Azul brilhante de Comassie	-
Lipídeos	Lipídeos totais	Sudam Black	+
	Lipídeos ácidos	Sulfato azul de Nilo + H ₂ SO ₄	+
	Ác. graxos	Acetato de cobre + Ác. rubeânico + Na ₂ EDTA	+
	Terpenos	Nadi	ND
Oxalato de Cálcio		Ácido sulfúrico	+

+: positivo; -: negativo; ND: Não detectado na histoquímica.

Análises físicas, físico-químicas e fitoquímicas

A granulometria do pó das folhas de *A. excelsum* demonstrou que, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), o pó é classificado como grosso (Figura 5) e, segundo o índice de Sauter, o pó apresenta diâmetro médio de 936 µm.

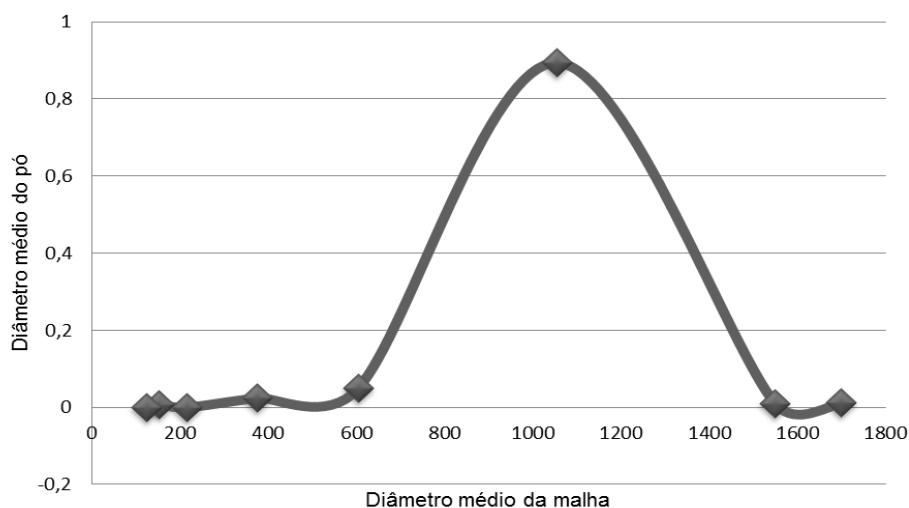


Figura 5: Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *A. excelsum*.

O teor de cinzas totais foi de $17,24\% \pm 0,32$. Este percentual constitui a matéria inorgânica não volátil que pode estar como contaminante no pó da planta.

Com relação aos rendimentos extrativos, o extrato etanólico apresentou um rendimento de 38,82%, este foi submetido ao fracionamento, do qual se obteve três frações, sendo o maior rendimento observado para a fração de Diclorometano (FDCM/EEAE), como demonstra a Tabela 2. A extração seletiva para alcaloides também foi realizada, sendo observado melhor rendimento para o extrato de alcaloides neutros com 18,22%.

Tabela 2: Rendimentos extrativos obtidos a partir das folhas de *A. excelsum*.

Extrato Etanólico/ Frações/ Extração seletiva	EEAE	FDCM/EEAE	FAcOEt/EEAE	FMeOH/EEAE	AAE	AAAE	ANAE
Peso (g)	1000	10	10	10	333	236	-
Rendimentos (%)	38,82	52,9	18	14,8	0,021	0,004	18,22

AAE: Alcaloides de *A. excelsum*; AAAE: Alcaloides ácidos de *A. excelsum* e ANAE: Alcaloides neutros de *A. excelsum*.

Na prospecção fitoquímica realizada por CCD constatou-se a presença de taninos e polifenóis, heterosídeos flavônicos, triterpenos e esteroides e alcaloides (Tabela 3, Figura 6).

Tabela 3. Prospecção fitoquímica por CCD do extrato etanólico das folhas de *A. excelsum*.

CMS	Taninos e Polifenóis	Geninas flavônicas	Heterosídeos flavônicos	Geninas antraquinônicas e naftoquinônicas	Heterosídeos antracênicos	Triterpenos e esteroides	Cumarinas	Saponinas	Heterosídeos cardiotônicos	Alcaloides
EEAE	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+

+: indicação de presença; -: indicação de ausência; EEAE: Extrato etanólico de *A. excelsum*; CMS: Classe de metabólitos secundários.

Em todas as detecções por CCD, as bandas reveladas apresentaram RF distintos, evidenciando tratar-se de várias substâncias, como exibido na Figura 5.

Os melhores cromatogramas obtidos por CLAE foram na faixa de comprimento de onda de 220nm. A avaliação do EEAE evidenciou a predominância de compostos polares e alguns de baixa polaridade. Os espectros UV com TR 1,2 e 1,8 do extrato etanólico são sugestivos para alcaloides, a percentagem de área maior que 29% demonstra que são majoritários na amostra (Figura 7A). O cromatograma da FAcOEt/EEAE (Figura 7B) exibiu picos com TR até 2 minutos, correspondentes a percentagem de área maior que 13,47%. Estes constituintes são os mesmos encontrados no EEAE,

isto sugere que estão em maior quantidade na fração de AcOEt, sendo esta indicada para o processo de purificação e isolamento.

O perfil da FDCM/EEAE (Figura 7C) apresentou constituintes de alta e média polaridade. A presença de proantocianidinas é deduzida a partir dos espectros no UV do pico 1 (TR=0,5 min) com comprimento de onda em 375,6 nm, pico 9 (TR=11,3 min) com comprimento de onda em 376,8 nm e pico 10 (TR=48,4) com comprimento de onda em 376,8 nm.

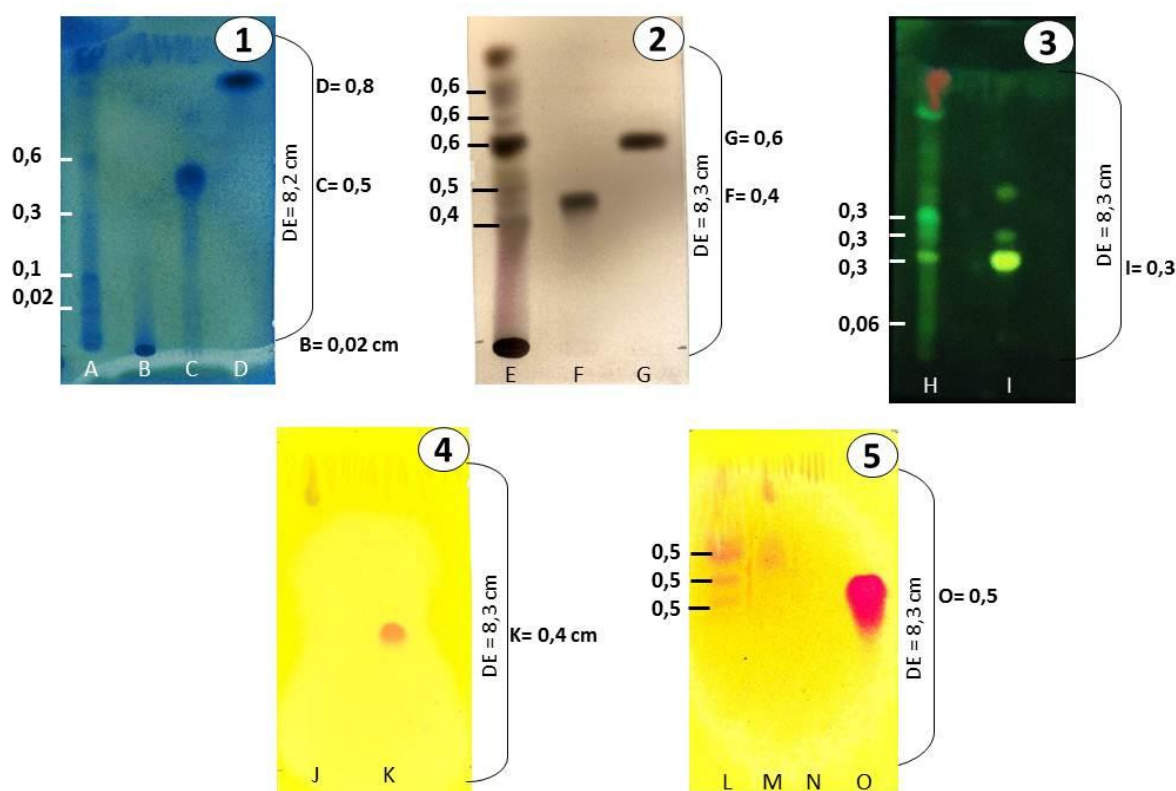


Figura 6: CCD do Extrato etanólico de *A. excelsum* (EEAE). A, E, H, J: EEAE. **1. Taninos e polifenóis.** Eluente: acetato de etila; clorofórmio; ác. acético e água (100:11:11:27). Revelador: Ferricianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2%. B, C, D: Amostras de referência Ác. tânico, Proantocianidina B2 e Pirrogallol respectivamente. **2. Triterpenos e esteroides.** Eluente: hexano; acetato de etila (1:1). Revelador: reagente de Liebermann-Burchard. F, G: Amostra referência, Ác. betulínico e Lupeol respectivamente. **3. Heterosídeos flavônicos.** Eluente: Acetato de etila; Ác. fórmico; Ác. acético e água (100:11:11:27). Revelador: Cloreto de alumínio. I: Amostra de referência Rutina. **4. Alcaloides.** Eluente: acetato de etila; ác. fórmico; ác. acético e água (50:7:3:10:30). Revelador: Reagente de Dragendorff. K: Amostra de referência Quinina. **5. Extração seletiva para alcaloides.** L, M, N: alcaloides; alcaloides ácidos e alcaloides neutros respectivamente. O: Amostra de referência Quinina; (DE): Distância percorrida pelo eluente.

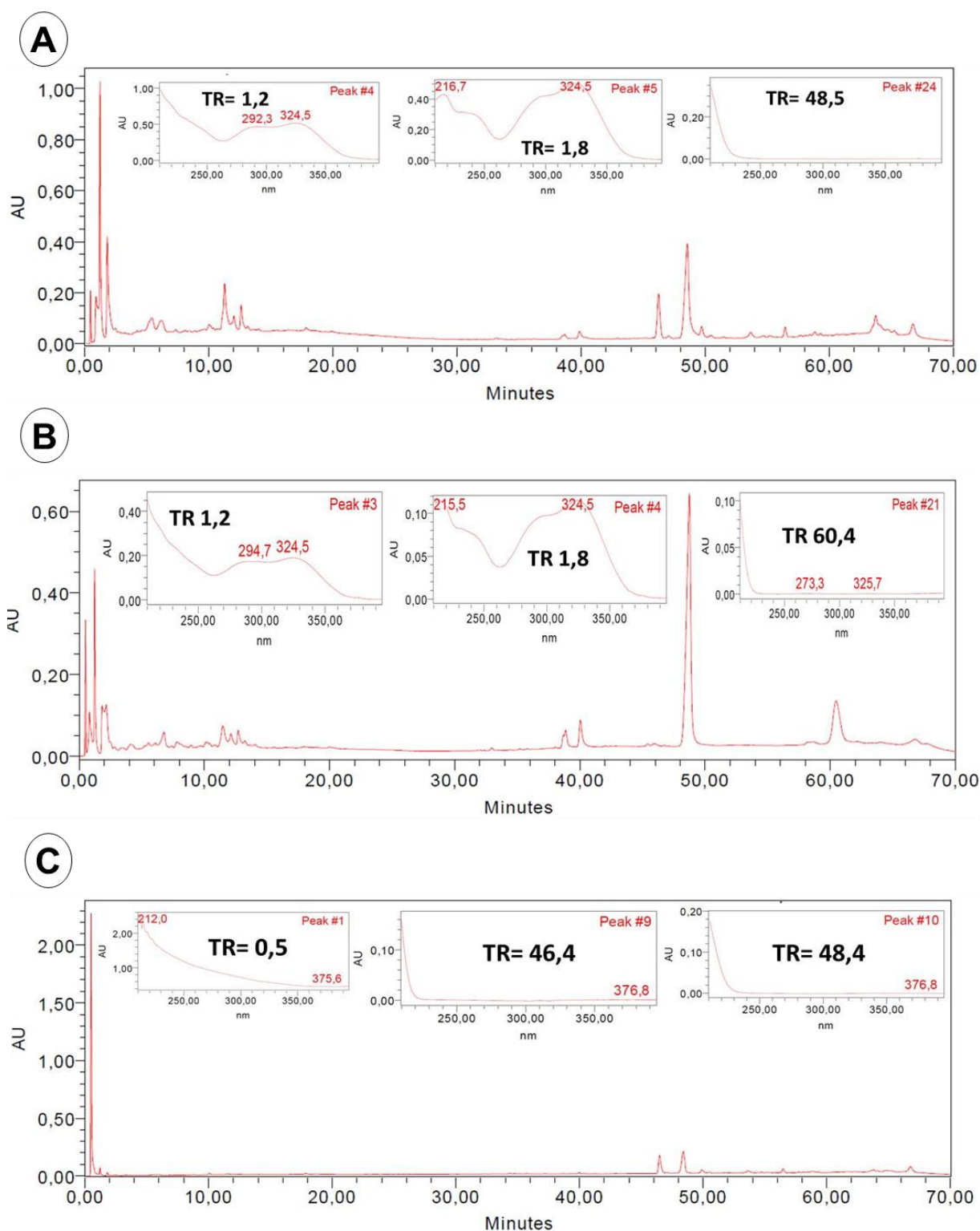


Figura 7: Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD. A: EEAE, B: FAcOEt/EEAE, C: FDCM/EEAE. Sistema de Eluição: gradiente H₂O (0,1% H₃PO₄) e Acetonitrila em um período de eluição linear (5 – 95% ACN de 0 a 60 min), (95% ACN de 60 a 65 min) e um curto período de eluição isocrática (5% ACN de 65 a 70 min). Fluxo de 1 mL/min. Coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 mm, 250 x 4 mm d.i.). Detecção UV220-400 nm.

Discussão

Aspidosperma excelsum apresenta características conservativas com outros representantes do gênero (Albuquerque, 1971; Pacheco, 1979; Quinet & Andreatta, 2005; Demarco et al., 2006; Reis, 2008; Añez, 2009; Krentkowski & Duarte, 2012), tais como: estratificações da epiderme foliar, ornamentação da cutícula e cera epicuticular, tipos e localizações dos estômatos e tricomas, organização do mesofilo e pecíolo, tipos e localização dos idioblastos e laticíferos. Estas características são também consideradas comuns para Apocynaceae (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950; Cronquist 198).

A presença de cutícula espessa e cera epicuticular em *A. excelsum*, é recorrente em espécies xerófitas (Esau, 1974), mas pode ser justificada neste caso devido a planta ser emergente, ficando exposta à radiação solar. Seria necessário, portanto, aliar observações anatômicas e ecofisiológicas para diferenciar quais estruturas são ajustáveis ao ambiente e quais são puramente hereditárias (Scremin-Dias, 2007).

Foi verificado em *A. excelsum*, elevação na borda periestomática e estrias epicuticulares anexas às células guarda dos estômatos anomocíticos. Do mesmo modo, ao estudar outras espécies de *Aspidosperma*, Albuquerque (1971) encontrou estômatos anomocíticos e raros anisocíticos, com células anexas apresentando estrias epicuticulares. E Larrosa & Duarte (2005) visualizaram em *Himatanthus sucuuba*, folhas hipoestomáticas com estômatos anomocíticos formando borda periestomática evidente, devido elevação da cutícula.

O tipo de indumento observado nos tricomas de *A. excelsum* poderia ser uma característica distintiva entre as espécies de *Aspidosperma*, pois segundo Theobald et al. (1979), a ornamentação dos tricomas pode delimitar gêneros e até espécies. Entretanto, tal caráter não é diagnóstico para as carapanaúbas, uma vez que Reis (2008) também localizou tricomas tectores com parede ornamentada nas espécies *A. excelsum*, *A. carapanauba*, *A. desmanthum* e *A. spruceanum*. Este autor afirmou ainda que o tricoma encontrado na primeira espécie supracitada é pluricelular, enquanto neste estudo foi constatado que o mesmo é unicelular.

O presente estudo corrobora os dados de Pacheco (1979), pois detectou cicatrizes na face adaxial, resultantes da queda dos tricomas e que os tricomas tectores encontram-se em maior abundância na face abaxial. Enquanto Añez (2009) verificou a presença destes em *A. nitidum* e *A. marcgravianum*, Krentkowski & Duarte (2012) constataram além de tricomas tectores simples, tricomas multicelulares em *A. olivaceum* e *A. polyneurum*, ambos com paredes espessadas e ápices agudos. Ao comparar os resultados destes autores entre si é possível conjecturar que os tricomas tectores são abundantes em espécies de *Aspidosperma* independente de seus domínios fitogeográficos, sendo os tricomas glandulares raros nas mesmas.

A constatação de laticíferos articulados ramificados na espécie, objeto deste estudo, pode ser considerada rara, pois foi relatada apenas para *A. australe* (Demarco et al. 2006). Para a maioria das espécies de Apocynaceae, os laticíferos são citados como não articulados (Solereder, 1908; Metcalfe, 1967; Yoder & Mahlberg, 1976; Wilson & Mahlberg, 1978; Murugan & Inamdar, 1987; Inamdar et al., 1988; Roy & De, 1992; Mahlberg, 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita, 1997).

Santos et al. (2013), também localizaram idioblastos e laticíferos em *P. fasciculata*, com as mesmas substâncias, diferindo unicamente pela presença de polissacarídeos. Na histoquímica de *A. excelsum*, não se detectou a presença de alguns compostos diagnosticados na fitoquímica, pois o conteúdo dos idioblastos apresenta constituição heterogênea. Com relação aos flavonoides, assim como na fitoquímica, utilizou-se cloreto de alumínio como reagente revelador; entretanto, as substâncias não absorveram o comprimento de onda específico. A utilização de material processado no teste pode ter influenciado a não detecção deste constituinte. Os terpenos também não foram detectados, provavelmente devido aos procedimentos de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal, etapas que dificultam a preservação de compostos voláteis, tais como óleos essenciais e ácidos resínicos.

Os parâmetros de granulometria e teor de cinzas totais do pó das folhas de *A. excelsum* foram aqui relatados pela primeira vez; desta forma, passa a constituir especificação farmacopeica.

A pulverização satisfatória do pó é imprescindível para alcançar um rendimento ótimo no processo extrativo. A granulometria é o parâmetro que determina a superfície de contato do pó disponível a interagir com o solvente (Alves et al., 2008). Constatou-se que o diâmetro do pó atingido a partir da pulverização das folhas de *A. excelsum* foi adequado, pois o extrato etanólico exibiu rendimento de 38,8%. Este foi superior ao obtido por Dolabela (2007), que ao avaliar extratos de três espécies de *Aspidosperma*, preparados pelo mesmo método do presente estudo, verificou que a espécie *A. parvifolium* apresentou rendimento de 31,8352%.

A quantificação de cinzas revelou-se alta (17,24%) quando comparada com o teor de cinzas (6,07%) das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. (Alves et al., 2008) e praticamente equivalente ao teor (17,99%) exibido por *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis (Braga et al., 2007). Com relação à droga vegetal oriunda de uma mesma espécie, inúmeros fatores podem alterar esse teor, tais como: procedimentos de coleta, secagem, variações climáticas ou até localização geográfica (Alves et al., 2008).

A determinação de cinzas constitui critério de pureza da droga vegetal, pois permite quantificar o resíduo inorgânico presente nesta, e representado, em particular, por carbonatos, cloretos e diversos tipos de óxidos (Costa, 1982). O alto teor de cinzas que compõe o pó das folhas de *A. excelsum* pode não expressar impurezas, visto que as análises estruturais mostraram a presença de idioblastos cristalíferos, que são provenientes da própria fisiologia da planta. E ainda considerando que a espécie deste estudo foi coletada em ambiente de várzea, local sujeito a inundações periódicas, sabe-se que as plantas aquáticas ou sujeitas a inundações são sorventes naturais de substâncias químicas, o que pode influenciar em maior absorção de compostos inorgânicos pela planta (Rubio et al., 2004).

Os constituintes químicos mais encontrados na família Apocynaceae são: glicosídeos cardioativos e cianogenéticos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis e triterpenóides (Evans, 2002). No que concerne o gênero *Aspidosperma*, estudos relatam a

predominância de alcaloides indólicos (Bolzani et al., 1987; Pereira et al.; 2006; Pereira et al., 2007). Além destes, nas folhas de *A. excelsum* foram encontrados triterpenos, esteroides e compostos fenólicos. Foi observada a ocorrência de cumarinas, taninos e glicosídeos cardíacos nas cascas da mesma espécie (Añez, 2009).

Pelo método de precipitação descrito por Matos (1997), foram detectados saponinas, açúcares redutores, taninos, alcaloides, cumarinas e glicosídeos cardioativos no extrato hidroalcoólico das cascas de *A. excelsum* (Añez, 2009; Gomes, 2011), assim como no extrato etanólico das cascas desta espécie (Martins, 2012). Analisando o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. excelsum* foram detectados cumarinas, taninos, antocianinas, flavonoides, triterpenos, esteroides, glicosídeos cardioativos e alcaloides (Añez, 2009). Utilizando o método de CCD descrito por Wagner et al. (1984), Martins (2012) constatou a ocorrência de esteroides, triterpenoides, alcaloides e taninos no extrato hidroalcoólico das cascas *A. excelsum*. Neste estudo, pelo método de Wagner et al. (1984), foi constatado, no extrato etanólico das folhas de *A. excelsum*, a presença de triterpenos, esteroides, compostos fenólicos e heterosídeos flavônicos. Os resultados encontrados demonstram haver diferença de sensibilidade entre os métodos utilizados para a detecção de constituintes químicos.

Na CCD foi detectada uma substância com Rf muito semelhante ao triterpenoide lupeol, sugerindo que a planta estudada possa contê-lo. O lupeol foi isolado de *A. parvifolium* (Jacome et al., 2004) e *Parahancornia fasciculata* (Silva, 2012). Este composto é comum em uma variedade de plantas terapêuticas (Gallo & Sarachine, 2009), sendo relatadas para o mesmo atividades antiplasmódica (Alves et al., 1997), leishmanicida e trypanosomicida (Fournet et al., 1992).

Das cascas do caule de *A. tomentosum* foi isolado e identificado o flavonóide 3-Ometilquercetina (Epifânio et al., 2007). Santos et al. (2013) quantificaram o teor de flavonoides totais contido nas folhas de amapá amargo (*P. fasciculata*), na quantidade de $0,32 \pm 0,002$ mg de flavonoides totais por grama de folha seca. A partir das folhas de *A. macrocarpon* foi isolado o flavonoide rutina (Bannwart et al., 2013). No presente estudo, a prospecção em CCD para

flavonoides apresentou Rf semelhante ao da Rutina, porém não foi relatado, ainda na literatura, o isolamento deste metabolito na espécie.

Ao avaliar, por CCD, o extrato etanólico obtido das folhas de cinco espécies de *Aspidosperma* do Cerrado, Dolabela (2007) verificou que apenas dois revelaram-se positivos para alcaloides. Estes foram encontrados ainda nos extratos etanólicos das cascas de *A. cylindrocarpon*, *A. olivaceum*, *A. ramiflorum* e *A. spruceanum* (Dolabela, 2007). No presente estudo, porém, não foram detectados alcaloides no extrato etanólico das folhas de *A. excelsum* através deste método, o que pode sinalizar que este metabolito, se presente, encontra-se em concentrações muito reduzidas. Possivelmente este composto seja sintetizado nas estruturas secretoras/ armazenadoras das folhas e translocado para as cascas, local de maior armazenamento.

Conclusões

As análises anatômica revelaram que idioblastos e laticíferos constituem as principais estruturas secretoras das folhas de *A. excelsum*. Parâmetros farmacognósticos, inerentes a granulometria e cinzas totais, foram estabelecidos pela primeira vez para as folhas de *A. excelsum*. A prospecção fitoquímica do EEAE indicou a presença de alcaloides, taninos, polifenóis, esteroides e triterpenoides. A maioria destes constituintes está em consonância com as análises histoquímicas. O baixo teor de alcaloides presentes nas folhas de *A. excelsum*, porém relatado em maior concentração nas cascas em outros estudos, poderia justificar o uso tradicional destas pelas populações amazônicas. Contudo as folhas devem ser consideradas como alvo de bioprospecção pela indústria farmacêutica, devido possuírem metabólitos ativos. A ausência de estudos sobre a atividade biológica dos extratos das folhas de *A. excelsum* salienta a necessidade de futuros estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos.

Referências bibliográficas

- Akisue, G., Oliveira, F., 1987. *Farmacobotânica*. São Paulo: Pharmakon. 1, 263p.
- Albuquerque, B.W.P., 1971. Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia Brasileira (Apocynaceae): *Aspidosperma carapanauba* Pichon, *A. marcgravianum* Woodson e *A. oblongum* A. DC. *Acta Amaz.* 1, 9-20.
- Almeida, C.F.C.B., Albuquerque, U.P., 2002. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco: um estudo de caso no Agreste. *Intercien.* 26, 276-285.
- Alves, R.R.N., Silva, C.C., Alves, H.N., 2008. Aspectos sócioeconômicos do comércio de plantas e animais medicinais em área metropolitanas do Norte e Nordeste do Brasil. *Rev. biol. ciênc. terra.* 1.
- Alves, T.M.A., Nagem, T.J., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., Zani, C.L., 1997. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. *Planta Med.* 63, 554-555.
- Añez, R.B.S., 2009. Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica. Manaus, 55p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.
- Appezato-Da-Glória, B., Estelita, M.E.M., 1997. Laticifer systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* - Apocynaceae. Modoiwa. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66, 301-306.
- Bannwart, G., Santin, S., Schuquel, I., Kato, L. Oliveira, C., Bannwart, E., Leite, C., 2013. Flavoinóide e triterpeno isolados das folhas da *Aspidosperma macrocarpon*. 53th CBQ Congress. Rio de Janeiro, Brazil.
- Barbosa, W.L.R., Tavares, I.C.C., Soares, D.C., 2003. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl.. *Rev. bras. farmacogn.* 13, 6-8.
- Bolzani, V.S., Serur, L.M., Matos, F.J.A., Gottlieb, O.R., 1987. Indole alkaloids evolution in *Aspidosperma*. *Biochem. Sys. Ecol.* 15, 187-200.
- Bozzola, J.J., Russell, L.D., 1991. Electron microscopy. In: Bozzola, J.J. & Russell, L.D. (org.) *Principles and Techniques for Biologists*. Jones & Bartlett, Boston. 40-61.
- Braga, T.V., Oliveira, T.T., Pinto, J.T., Dores, R.G.R., Nagem, T.J., 2007. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28, 287-290.
- Cain, A.J., 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Quart. J. Microsc. Sci.* 88, 383-92.
- Costa, A.F., 1982. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.
- Cronquist, A., 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press.
- David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration differentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci.* 258, 1338-1340.

- Demarco, D., Kinoshita, L.S., Castro, M.M., 2006. Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. *Rev. bras. Bot.* 29, 133-144.
- Di stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A., 2002. Gentianales medicinais. In: Di stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora UNESP. 375- 392.
- Dolabela, M.F., 2007. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *E. febrífuga* (A.St.Hill.)Juss. Ex. Mart. (Rutaceae) e espécies de *Aspidosperma* Mart.(Apocynaceae). 154p. Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Epifânio, W.A.N., Oliveira, M.P., Melo, G.M.A., Silva, S.A.S., Moreira, M.S.A., Sant'Ana, A.E.G., Araújo Júnior, J.X., 2007. Isolamento de flavonóide das cascas do caule de *Aspidosperma tomentosum* e atividade analgésica preliminar. 3th RASBQ. Águas de Lindóia, Brazil.
- Esau, K., 1974. *Anatomia das Plantas com sementes*. Edgard Blucher, São Paulo.
- Evans, W.C., 2002. The plant and animal kingdoms as sources of drugs. In: Trease and Evans Pharmacognosy. W. B. Saunders Company. 11- 49.
- Farmacopéia Brasileira, 2010. 5ª ed. Brasília: Anvisa.
- Franklin, G.L., 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and Wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature* 155, 51p.
- Fournet, A., Barrios A.A., Munõz, V., Hocquemiller, Cavé, A., 1992. Effects of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 43, 219-222.
- Ganter, P., Jollés, G., 1969, 1970. Histologie normale et pathologique. Gauthier-Villars, Paris.
- Gerlach, G., 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gomes, L.F.S., 2011. Abordagem Fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae). 98 p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará.
- Inamdar, J.A., Murugan, V., Subramanian, R.B., 1988. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Ann. Bot* 62, 583-588.
- Jácome, R.L.R.P., Oliveira, A.B., Raslan, D.S., Wagner, H., 2004. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-Pereira"). *Quim Nova.* 27, 897-900.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill.
- Krentkowski, F.L., Duarte, M.R., 2012. Morpho-anatomical analysis of *Aspidosperma olivaceum* and *A. polyneuron*, Apocynaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 22, 937-945.
- Larrosa, C.R.R., Duarte, M.R., 2005. Contribuição ao estudo anatômico do caule de *Himatanthus sukuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae. *Rev Bras Farmacogn.*, 15, 110-114.
- Mace, M.E., Howell, C.R., 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in root of cotton seedlings. *Can. J. Bot.* 52, 2423-2426.
- Mahlberg, P.G., 1993. Laticifers: an historical perspective. *Bot Rev* 59, 1-23.

- Martins, M.T., 2012. Estudo farmacognóstico, fitoquímico e de atividades biológicas de *Aspidosperma nitidum* Benth. ex Müll. Arg. 125p. Dissertação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará.
- Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza-CE: Edições UFC.
- Metcalfe, C.R., 1967. Distribution of latex in the plant kingdom. *Econ. Bot.* 21, 115-127.
- Metcalfe, C.R., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses*. Clarendon Press, Oxford.
- Milanez, F.R., 1960. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). *Rodriguésia* 36, 99-128.
- Milliken, W., 1997. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Econ. Bot.* 3, 212-237
- Ming, L.C., 1994. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia. *Hortic. bras.* 12, 9-13.
- Murugan, V., Inamdar, J.A., 1987. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. *Proc. Indian Acad. Sci.* 97, 25-31.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Pacheco, J.M., 1979. Estudo farmacognóstico do *Aspidosperma pyrifolium* Mart. popularmente conhecido por Pereiro-preto. *Arq. Jard. Bot. Rio Jan.* 23, 115-125.
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry - Theoretical and Applied*. 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Pereira, M.M., Jácome, R.L.R.P., Alcântara, A.F.C., Alves, R.B., Raslan, D.S., 2007. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quím Nova* 30, 970-983.
- Pereira, M.M., Souza, J.S.N., Alcântara, A.F.C., Piló-Veloso, D., Alves, R.B., Machado, P.O., Azevedo, A.O., Moreira, F.H., Castro, M.A.S., Raslan, D.S., 2006. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Rev. bras. plantas med.* 8, 1-8.
- Pizzolato, T.D., Lillie, R.D., 1973. Mayer's tannic acid-ferroc chloride stain for mucins. *J Histochem. Cytochem.* 21, 56-64.
- Potiguara, R.C.V., Silva, R.J.F., Kikuchi, T.Y.S., Lucas, F.C.A., Macedo, E.G., 2013. *Estruturas vegetais em microscopia eletrônica de varredura*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade do estado do Pará, Belém.
- Quinet, C.G.P., Andreato, R.H.P., 2005. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae Adans. na reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisas Bot* 56: 13-74.
- Rapini A 2004. Apocynaceae (dogbane and milkweed family). In: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, & Heald SV. *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton: Princeton University Press.
- Reis, A.R.S., 2008. Anatomia foliar e o xilema secundário de espécies de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). 93p. Dissertação em Botânica Tropical, Universidade Federal Rural da Amazônia.

- Roy, A.T., De, D.N., 1992. Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. *Ann. Bot.* 70, 443-449.
- Rubio, J., Schneider, I.A.H., Ribeiro, T., Costa, C.A., Kallfez, C.A., Plantas aquáticas: sorventes naturais. *Ciência Hoje*. 35, 68-71.
- Santos, A.C.F., Aguiar-Dias, A.C.A., Amarante, C.B., Coelho-Ferreira, M., 2013. Estruturas secretoras da lâmina foliar de amapá amargo (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histoquímica e doseamento de flavonoides. *Acta. Amaz.* 43, 407 – 414.
- Scatena, V.L., Scremin-Dias, E., 2003. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: Appezzato-da-Glória, B.A. & Carmello-Guerreiro, S.M (Eds.) *Anatomia Vegetal*. 3, 109-127.
- Scremin-Dias, E., 2007. Anatomia ecológica de espécies nativas: relação entre o ambiente e a estrutura é casual ou adaptativa. In: Barbosa LM & Santos JR. *A botânica no Brasil: Pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. 384-388.
- Silva, L.M., Alquini, Y., Cavallet, V.J., 2005. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Bot. Bras* 19, 183-194.
- Silva, A.O., 2012. Estudo fitoquímico e atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* dos extratos, frações e substância pura das cascas de *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae) 118p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará.
- Solereider, H., 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, Clarendon Press, Oxford.
- Theobald, W., Krahulik, J., Rollins, R., 1979. Trichome description and classification. In: Metcalfe, C. & Chalk, L. (eds.). *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press. 2, 40-53.
- Verpoorte, R., Kos-Kuyck, E., Tjin, A., Tsoi, A., Ruigrok, C.L.M., De Jong, G., Baerheim, S.A., 1983. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. *Planta Med.* 48, 283–9.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainsky, E.M., 1984. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer.
- Wilson, K.J., Mahlberg, P.G., 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). *Am. J. Bot.* 65, 98-109.
- Yoder, L.R., Mahlberg, P.G., 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *Am. J. Bot* 63, 1167-1173.