

LEONOR MONTEIRO DO NASCIMENTO

ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO CAULE DE
***Tynanthus fasciculatus* Miers (BIGNONIACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N244a
2008

Nascimento, Leonor Monteiro do, 1970-

Anatomia, histoquímica e prospecção fitoquímica do
caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae)
/ Leonor Monteiro do Nascimento. – Viçosa, MG, 2008.
viii, 53f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cipó-cravo - Anatomia. 2. Cipó-cravo -
Histoquímica. 3. *Tynanthus fasciculatus*. 4. Plantas
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

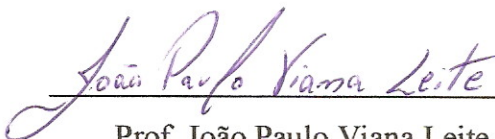
CDD 22.ed. 583.95

LEONOR MONTEIRO DO NASCIMENTO

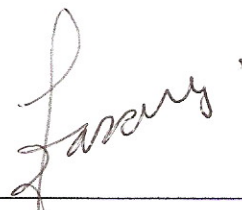
ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO CAULE DE
Tynanthus fasciculatus Miers (**BIGNONIACEAE**)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

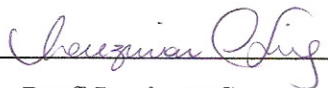
APROVADA: 01 de setembro de 2008



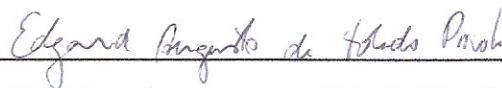
Prof. João Paulo Viana Leite
(Co-Orientador)



Prof. Adilson A. Zacaro
(Co-Orientador)



Profª Luzimar Campos da Silva



Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli



Profª Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, ressaltando a dedicação e a atenção dos que nominalmente estão citados:

Aos pais pelo apoio, sem o qual este trabalho não seria concluído;

Às foférrimas (Marina, Vanessa e Yukie) pelas alegrias;

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade;

À Profª Marília Contin Ventrella, amiga e orientadora, por todo apoio e incentivo na execução deste trabalho e da Phyton Plantas Medicinais;

Ao Profº João Paulo Viana Leite pela ajuda na execução deste trabalho e pelas palavras de incentivo;

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Botânica pelos ensinamentos;

Ao Sr. Vicente (Grupo Entre-Folhas) e Sr. Sebastião Lopes de Faria Sobrinho (Silvivultura) pela inestimável ajuda no trabalho de campo;

À Dª Edite pelos ensinamentos técnicos e pela amizade;

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Botânica e do Laboratório de Anatomia Vegetal: Cristina, Marina, Joseane, Roseane, Sebastião, Victor, Bruno, Diego, Lourdes, Ana Cláudia, Jaqueline, Flávia, Patrícia, Advânio e Bárbara;

Aos colegas do Herbário: Ricardo, Livia, Márcia, Sileimar e José;

Aos amigos de Viçosa: Argeu, Luisa de Marilac, Luciene, Lúcia, Rogerinho, Andréa, Serginho Japa, Viviane e Elge;

Ao Santo Daime, pela força e pela firmeza para seguir na jornada.

BIOGRAFIA

LEONOR MONTEIRO DO NASCIMENTO, filha de David G. Nascimento e Maria Laide M. Nascimento, nasceu em Piedade do Rio Grande, Minas Gerais, em 28 de fevereiro de 1970. Em julho de 1996, graduou-se em Farmácia – Bioquímica de Alimentos pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Atuou como farmacêutica responsável-técnica desde 1996, passando por diversos serviços na área de saúde, como Vigilância Epidemiológica, Vigilância Sanitária e Farmácia de Manipulação. De 1999 a 2005 atuou como sócio-fundadora da empresa Phyton Plantas Medicinais, na produção e comercialização de plantas medicinais. Atuou como farmacêutica responsável-técnica de dezembro de 2004 a junho de 2007. No 1º semestre de 2005 atuou como docente na FAMINAS, em Muriaé, na disciplina de Farmacotécnica I. Neste mesmo ano iniciou a especialização *Latu sensu* “Farmacologia: atualizações e novas perspectivas”, na Universidade Federal de Lavras, concluída em 2007. Em maio de 2006, iniciou o programa de pós-graduação em Botânica, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, seguindo a linha de pesquisa de Anatomia de Plantas Vasculares, defendendo tese em setembro de 2008, sob a orientação da professora Marília Contin Ventrella e co-orientação dos professores João Paulo Viana Leite e Adilson A. Zacaro.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento do caule de <i>Tynanthus fasciculatus</i> Miers (Bignoniaceae): estrutura da casca e do lenho	6
Resumo	6
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados	11
Discussão	24
Conclusões	28
Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO 2: Anatomia, histoquímica e triagem fitoquímica da casca do caule de <i>Tynanthus fasciculatus</i> Miers (Bignoniaceae)	31
Resumo	31
Introdução	32
Material e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	44
Conclusões	48
Referências Bibliográficas	48
CONCLUSÕES GERAIS	53

RESUMO

NASCIMENTO, Leonor Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2008. **Anatomia, histoquímica e prospecção fitoquímica do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae).** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Co-Orientadores: João Paulo Viana Leite e Adilson A. Zacaro.

Tynanthus fasciculatus Miers (Bignoniaceae), popularmente conhecido como cipó-cravo, é uma liana com odor característico de cravo-da-Índia, utilizada na medicina tradicional e apresentando ação farmacológica comprovada como antimalárico, antiinflamatório e bactericida. O objetivo deste trabalho foi caracterizar anatomicamente o desenvolvimento do caule de *T. fasciculatus* e associar a estrutura da casca com a presença de grupos químicos de interesse farmacológico. Para a análise estrutural, porções do caule em diferentes estádios de desenvolvimento foram processadas de acordo com as técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura. Para a análise histoquímica, seções transversais da casca fresca foram submetidas a diversos corantes e reagentes. Para a prospecção fitoquímica, os extratos hexânico e metanólico da casca foram submetidos ao estudo por cromatografia de camada delgada (CCD). A atividade cambial do caule inicia-se precocemente, formando uma massa de xilema secundário usual ao redor da medula. O felogênio se origina de uma camada colenquimática subepidérmica, persistindo durante o desenvolvimento do caule. Até esse estágio, o crescimento secundário pode ser considerado usual. Posteriormente, quatro porções da faixa cambial, opostas entre si, duas a duas, diminuem drasticamente a produção de xilema secundário para o interior e passam a produzir grande quantidade de floema secundário para o exterior. A partir deste estágio o crescimento secundário é considerado não-usual, e tanto o xilema secundário como o floema secundário produzidos apresentam elementos condutores de maior diâmetro. Subseqüentemente, surgem novas porções da faixa cambial com atividade não-usual, adjacentes às aquelas já estabelecidas, conferindo aspecto de cruz-de-Malta à massa xilemática. O lenho apresenta vasos dispostos em faixas tangenciais. Predominam elementos de vaso largos e curtos, com pontoações areoladas e placas de perfuração simples,

frequentemente obliterados por tiloses. O parênquima axial é do tipo em faixas, delimitado por fibras. Os raios são homocelulares e multisseriados. O floema secundário inserido na massa xilemática tem predomínio de elementos condutores com placas crivadas compostas, associados à pequena quantidade de parênquima axial, dispostos em faixas alternadas com fibras, e raios unisseriados. Na casca, o floema secundário tem elementos condutores inconspícuos associados a grande quantidade de parênquima axial, formando faixas alternadas com fibroesclereídeos. Os raios também são homocelulares e multisseriados. O córtex é mantido junto à periderme, e a atividade do felogênio é persistente, constituindo periderme com feloderme pluriestratificada, súber e lenticelas. Os principais grupos de compostos identificados por ambas as técnicas são compostos fenólicos, alcalóides e terpenos, todos localizados nas células parenquimatosas da casca e do floema secundário inserido na massa xilemática. Os taninos e saponinas foram identificados apenas por CCD. A caracterização estrutural do caule e a histolocalização e identificação química dos compostos do metabolismo secundário no caule de *T. fasciculatus* fornecem subsídios para a utilização das cascas como droga vegetal e acrescentam dados à monografia já existente na Farmacopéia Brasileira.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Leonor Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2008.
Anatomy, histochemistry, and phytochemical prospection of *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae) stem. Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: João Paulo Viana Leite and Adilson A. Zacaro.

Tynanthus fasciculatus Miers (Bignoniaceae), commonly known as cipó-cravo, is a vine with a characteristic smell of clove, used in the traditional medicine and presents pharmacological action proved by its antimalaric, anti-inflammatory and its bactericide properties. The goals of this work were to characterize anatomically the development of the stem of *T. fasciculatus* and to associate the structure of the bark with the presence of chemical groups of pharmacological interest. Concerning the structural analyses, portions of the stem from different stages of development were processed according to the usual techniques under light and scanning electron microscopies. With regard to histochemical analysis, transversal sections from the bark were submitted to several stains and reagents. For the phytochemical prospection, the hexanic and methanolic extracts from the bark were submitted to the study through thin layer chromatography (TLC). The stem cambial activity begins precociously, forming a mass of usual secondary xylem around the medulla. The phellogen begins from a subepidermal collenchyma layer, persisting during the stem development. Until this stage, the secondary growth may be considered usual. Posteriorly, four portions of the cambial zone, opposed to each other, by pairs, decrease drastically the production of secondary xylem to the inside and begin the production of great quantity of secondary phloem to the outside. From this stage, the secondary growth was considered unusual, and both the secondary xylem and secondary phloem present conductive cells of high calibre. Subsequently, there come new portions of the cambial zone with unusual activity, adjacent to those already established, giving to the xylem mass a aspect of Maltese cross. The xylem presents vessels arranged in tangential strips. There is predominance of wide and short vessel elements, with bordered pits

and simple perforation plates, frequently obliterated by tyloses. The axial parenchyma is a banded parenchyma type, delimited by fibres. The rays are homocellular and multiseriate. The secondary phloem inserted in the xylem mass presents the predominance of sieve elements with compound sieve plates, associated to a little amount of axial parenchyma, arranged in strips alternated with fibers and uniseriate rays. In the bark, the secondary phloem presents inconspicuous sieve elements associated with a great amount of axial parenchyma, forming strips alternated with fibre-sclereids. The ray also are homocellular and multiseriate. The cortex is kept next to the periderm, and the phellogen activity is persistent, constituting a periderm with multistratified phelloderm, suber and lenticels. The main compound groups identified by both techniques are phenolic compounds, alkaloids and terpenes, all situated in the parenchymatous cells of the bark and the unusual secondary phloem inserted in the xylem mass. The tannins and saponis were identified only through TLC. The structural characterization of the stem and the histolocalization and the chemical identification of the compounds of the secondary metabolism in the *T. fasciculatus* stem give us a subsidy to use the bark as vegetal drug and contribute with more data to the already existent monograph in the Brazilian Pharmacopoeia.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas constituem a base do sistema de medicina tradicional em diversas regiões do mundo, e até hoje sustentam a produção de importantes drogas, seja como matéria-prima, fontes de protótipos para a síntese de moléculas de interesse farmacológico ou como fonte de novas moléculas bioativas (Gurib-Fakim, 2006). No Brasil, as plantas medicinais têm sido utilizadas tanto em áreas rurais como urbanas, sob formas tradicionais de preparo, ou manipuladas pela indústria farmacêutica. A adulteração, a substituição, a falta de padrão para a composição química, e a falta de estudos científicos que assegurem as propriedades farmacológicas e o uso terapêutico têm sido os principais problemas encontrados no uso de plantas medicinais (Rates, 2001). A atividade farmacológica de uma dada espécie geralmente está associada à presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, entre outros (Balandrin *et al.*, 1985). Esses metabólitos podem ser restritos a determinado taxon ou caracterizar quimicamente grandes grupos vegetais (Judd *et al.*, 2002). A família Bignoniaceae destaca-se entre as famílias botânicas onde os metabólitos secundários são de ocorrência comum (Gentry, 1980).

O Brasil é o centro de dispersão da família Bignoniaceae (Gentry, 1980), constituída por cerca de 120 gêneros e 650 espécies tropicais, e poucas distribuídas nas regiões temperadas (Barroso *et al.*, 1991). As lianas são predominantes na família Bignoniaceae (Barroso *et al.*, 1991), e estão associadas à ocorrência freqüente de padrões atípicos de crescimento secundário (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1957), denominados de crescimento secundário anômalo (Solereder, 1908; Boureau & Troisième, 1957; Metcalfe & Chalk, 1957; Mauseth, 1988; Dickison, 2000) ou não-usual (Fahn, 1989). Embora o termo “anômalo” seja de aceitação mais ampla, deve-se considerar que para o grupo de plantas em que ocorre, esse padrão de crescimento é normal, e não anômalo, enquanto que o termo “não-usual”, apenas faz distinção do padrão de crescimento secundário mais comum ou usual em

plantas lenhosas. Dos quatro padrões de crescimento não-usual ocorrentes em Bignoniaceae, o gênero *Tynanthus* se enquadra no tipo onde há quatro estrias de floema, formando ângulo reto entre si e cruzando a massa de xilema secundário, como uma cruz-de-Malta (Solereider, 1908; Metcalfe & Chalk, 1957; Boureau & Troisième, 1957).

Muitos metabólitos secundários são comumente encontrados nas Bignoniaceae, como glicosídeo iridóide e alcalóide iridóide, naftoquinonas e antraquinonas, complexos ésteres e glicosídeos de *o*-difenólico, taninos, flavonóides, antocianinas e carotenóides (Gentry, 1980). As naftoquinonas constituem o grupo mais freqüente, do qual se destaca o metabólito lapachol, com atividade citostática, bacteriostática, fungistática, cercaricida, tripanosomicida e antitérmica (Oliveira *et al.*, 1990). Muitos representantes das Bignoniaceae são considerados tradicionalmente como plantas medicinais, como algumas espécies do gênero *Tynanthus*, como *T. fasciculatus*, *T. elegans*, *T. cognatus* e *T. schumanianus*, que despertam interesse por apresentar propriedades terapêuticas diversas (Amorim *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2000; Bourdy *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2003).

T. fasciculatus é uma das espécies utilizadas popularmente, conhecido como cipó-cravo, cipó-cruz e clavo-huasca. O cheiro semelhante ao do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), associado ao hábito lianescente e ao aspecto de cruz-de-Malta do lenho em seção transversal, justificam os nomes comuns da espécie. A espécie é utilizada como tônico estomacal, carminativo, aromático, contra má digestão, afrodisíaco e tônico restaurador (Ming *et al.*, 1997; Botsaris & Machado, 1999; Mendes & Carlini, 2007); é rico em óleo essencial, glicosídeos, alcalóides (tinantina) e taninos (Botsaris & Machado, 1999). Há diferentes referências sobre a parte da planta utilizada, mas a maioria indica a casca do caule como droga vegetal (Farmacopéia Brasileira, 1959; Ming *et al.*, 1997; Mendes & Carlini, 2007). De modo geral, em grande número de espécies consideradas medicinais, as cascas são as partes da planta mais utilizadas depois das folhas, principalmente em áreas de mata (Ming *et al.*, 1997), onde o tronco é mais acessível que a copa. Desse modo, o estudo da casca torna-se

interessante, não só por sua complexidade estrutural, mas também pela riqueza em compostos do metabolismo secundário.

A literatura apresenta dados gerais sobre a anatomia e a presença de metabólitos secundários no gênero *Tynanthus*, e várias espécies do gênero apresentam indicações etnofarmacológicas e são popularmente conhecidas como cipó-cravo ou cipó-cruz. A Farmacopéia Brasileira (1959), por exemplo, descreve brevemente a estrutura morfoanatômica do caule de cipó-cravo como parâmetro de reconhecimento da droga, e o relaciona à *T. fasciculatus*, *T. elegans* e outras espécies do mesmo gênero. Assim, a identificação correta da droga e a consolidação do uso medicinal estão condicionadas a estudos mais detalhados sobre aspectos anatômicos, histoquímicos e químicos dos órgãos vegetativos aéreos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar anatomicamente o desenvolvimento do caule de *T. fasciculatus* e associar a estrutura da casca aos diferentes grupos de compostos secundários, por meio de técnicas histoquímicas e de triagem fitoquímica, o que pode contribuir para a identificação de material vegetativo e fornecer subsídios para a utilização da planta como droga vegetal, acrescentando dados à monografia já existente na Farmacopéia Brasileira.

O trabalho foi redigido na forma de dois capítulos, intitulados: “Desenvolvimento do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae): estrutura da casca e do lenho” e “Anatomia, histoquímica e prospecção fitoquímica da casca do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae)”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim A, Armada JL, Borba HR, Salles JF. 1994.** Testes de mutagenicidade em camundongos tratados com extratos aquosos de *Tynnanthus fasciculatus* Miers (cipó-cravo). *Revista Brasileira Farmácia* 75(2): 46-47.
- Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. 1985.** Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science* 228(4704):1154-1160.
- Barroso GM, Peixoto AL, Costa CG, Ichaso CLF, Guimarães EF, Lima HC de. 1991.** *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária. v.3.
- Botsaris AS, Machado PV. 1999.** Memento Terapêutico. *Flora Medicinal*
- Bourdy G, DeWalt SJ, Chávez de Michel LR, Roca A, Deharo E, Muñoz V, Balderrama L, Quenevo C, Gimenez A. 2000.** Medicinal plants uses of the Tacana, na Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 70:87-109.
- Boureau E, Troisième T. 1957.** *Anatomie végétale L'appareil végétatif des Phanérogames*. 1.ed. Paris: Press Universitaires de France. 633-651.
- Dickison WC. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Academic Press.
- Fahn A. 1989.** *Plant Anatomy*. 3.ed. Oxford: Pergamon Press.
- Farmacopéia Brasileira. 1959.** 2.ed. São Paulo: Siqueira.
- Fonseca SGC, Braga RMC, Santana DP. 2003.** Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia* 84(1): 9-16.
- Gentry AH. 1980.** *Bignoniaceae – Part I (Crescentieae and Tourrettieae)*. *Flora Neotropica* 25. New York: The New York Botanical Garden.
- Gurib-Fakim A. 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27:1-93.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 2002.** *Plants systematics: a phylogenetic approach*. 2.ed. Massachussets: Sinauer Associates, Inc.

- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*, 4.ed. California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Mendes FR, Carlini EA. 2007.** Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **109**:493-500.
- Metcalf CR, Chalk L. 1957.** *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Oxford University Press. v.2.
- Ming LC, Gaudêncio P, Santos VP dos. 1997.** *Plantas medicinais: uso popular na reserva extrativista “Chico Mendes”, Acre*. Botucatu: CEPLAM, UNESP.
- Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. 2000.** The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *Journal of Ethnopharmacology* **69**:139-155.
- Oliveira AB, Raslan DS, Miraglia MCM, Mesquita AAL. 1990.** Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova* **13**(4): 302-307.
- Rates SMK. 2001.** Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**:603-613.
- Solereider H. 1908.** *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press. v.1.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae): estrutura da casca e do lenho

RESUMO – *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae), conhecido popularmente como cipó-cravo, é uma liana com odor característico de cravo-da-Índia, utilizada como planta medicinal. O objetivo deste trabalho foi caracterizar anatomicamente o desenvolvimento e a estrutura do caule de *T. fasciculatus*, contribuindo para a identificação do material. Porções do caule em diferentes estádios de desenvolvimento foram processadas de acordo com as técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura. O caule primário tem estrutura eustélica, e a atividade cambial inicia-se num estágio de desenvolvimento em que os tecidos primários ainda não estão completamente diferenciados, produzindo xilema secundário para o interior e floema secundário para o exterior. Posteriormente, o felogênio inicia sua atividade, formado a partir de células da camada mais externa do colênquima. Até esse estágio, o crescimento secundário pode ser considerado usual. Posteriormente, quatro porções da faixa cambial, opostas entre si, duas a duas, diminuem drasticamente a produção de xilema secundário para o interior e passam a produzir grande quantidade de floema secundário para o exterior. A partir deste estágio o crescimento secundário é considerado não-usual, e tanto o xilema secundário como o floema secundário produzidos apresentam elementos condutores de maior diâmetro. Subseqüentemente, surgem novas porções da faixa cambial com atividade não-usual, adjacentes àquelas já estabelecidas, conferindo aspecto de cruz-de-Malta à massa xilemática. O lenho apresenta vasos dispostos em faixas tangenciais. Predominam elementos de vaso largos e curtos, com pontoações areoladas e placas de perfuração simples, freqüentemente obliterados por tiloses. O parênquima axial é do tipo em faixas, delimitado por fibras. Os raios são homocelulares e

multisseriados. O floema secundário inserido na massa xilemática tem predomínio de elementos condutores de grande diâmetro, com placas crivadas compostas, associados à pequena quantidade de parênquima axial, dispostos em faixas alternadas com fibras, e raios unisseriados. Na casca, o floema secundário tem elementos condutores inconspícuos associados a grande quantidade de parênquima axial, formando faixas alternadas com fibroesclereídeos. Os raios também são homocelulares e multisseriados. O córtex é mantido junto à periderme, e a atividade do felogênio é persistente, constituindo periderme com feloderme pluriestratificada, súber e lenticelas. A caracterização estrutural do caule de *T. fasciculatus* fornece subsídios para a identificação de estruturas vegetativas e acrescenta dados à monografia já existente na Farmacopéia Brasileira.

Introdução

Tynanthus fasciculatus Miers, popularmente conhecido como cipó-cravo, cipó-cruz ou cipó-trindade, é uma Bignoniaceae originária do Brasil, utilizada como planta medicinal por comunidades tradicionais. Os nomes usuais fazem referência ao odor semelhante ao do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), ao hábito lianescente e ao formato de cruz-de-Malta do lenho em seção transversal. Diferentes usos etnofarmacológicos são atribuídos a essa espécie, como tônico estomacal, carminativo, aromático (Botsaris & Machado, 1999), contra má digestão (Ming *et al.*, 1997), afrodisíaco (Botsaris & Machado, 1999; Mendes & Carlini, 2007) e tônico restaurador (Mendes & Carlini, 2007). Há referências sobre a utilização medicinal da planta inteira, da casca da raiz (Mendes & Carlini, 2007) ou do caule (Ming *et al.*, 1997), mas a Farmacopéia Brasileira (1959) indica apenas caule na descrição macroscópica da droga. *T. fasciculatus* é rico em óleo essencial, glicosídeos, alcalóides (tinantina) e taninos (Botsaris & Machado, 1999). Estudos etnobotânicos para identificação de plantas utilizadas tradicionalmente como medicinais (Ming *et al.*, 1997), indicam a casca do caule como uma das partes da planta com maior número de indicações de uso. Isto sugere que o acúmulo de compostos com potencial farmacológico, geralmente metabólitos secundários, ocorre freqüentemente na casca.

O Brasil é considerado o centro de dispersão da família Bignoniaceae, que tem distribuição predominantemente tropical, compreendendo muitas lianas, assim como alguns representantes arbóreos, arbustivos e mais raramente herbáceos (Gentry, 1974; Barroso *et al.*, 1991). As Bignoniaceae apresentam diferentes padrões de crescimento secundário denominados anômalos (Solender, 1908; Boureau & Troisième, 1957; Metcalfe & Chalk, 1957; Mauseth, 1988; Dickison, 2000) ou não-usuais (Fahn, 1989), principalmente nas lianas, como cunhas de floema no xilema, zonas secundárias de crescimento no córtex, xilema fissurado e arcos de feixes orientados inversamente na margem da medula.

O crescimento secundário não-usual também é comum em lianas de famílias de plantas não relacionadas, que apresentam variações da atividade cambial padrão (Fahn, 1989; Mauseth, 1988; Dickison, 2000). Muitas funções têm sido atribuídas ao crescimento não-usual das lianas, como aumento da flexibilidade e resistência do caule, limitação ou pré-determinação de padrões de clivagem, facilidade de clonagem, confinamento de doenças ou delimitação de áreas da planta, facilidade de escalada da planta, aumento de tecidos de reserva, proteção e manutenção do xilema e floema funcionais sob condições de alto estresse, rapidez na cicatrização, e aumento de conexões para raízes adventícias (Dickison, 2000).

Este trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento e a estrutura do caule de *Tynanthus fasciculatus*, contribuindo para a identificação de estruturas vegetativas e para a monografia da espécie na Farmacopéia Brasileira.

Material e Métodos

Foram coletadas porções de caule de três indivíduos de *Tynanthus fasciculatus* Miers. (Bignoniaceae), em diferentes estádios de desenvolvimento, desde regiões próximas ao meristema apical até regiões já lenhosas de 3-4cm de diâmetro, na Mata da Silvicultura do Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, MG (20°45'S, 42°55'W, altitude média de 690 m). Conforme classificação climática de Köppen, o clima regional é do tipo Cwb, mesotérmico úmido com verões chuvosos e invernos secos (Vianello e Alves, 1991).

Microscopia de Luz

O material foi fixado em FAA₅₀, por 48 horas, e conservado em etanol 70% (Johansen, 1940). Seções transversais e a superfície de caules em diferentes estádios de desenvolvimento

foram observados e fotografados em estereomicroscópio (Stemi 2000-C, Zeiss) com câmera digital (D-535, Olympus). O seccionamento do caule foi realizado à mão-livre, com navalha descartável para cortes histológicos (modelo 818, Leica) e também em micrótomo de deslize (SM 2000R, Leica). Amostras de caules em diferentes estádios de desenvolvimento, com aproximadamente 25 μm^2 , foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), conforme as recomendações do fabricante e, quando necessário, previamente amolecidas em etilenodiamina (Carlquist, 1982) 10%, por dez dias. Secções transversais, longitudinais tangenciais e radiais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica), com 5 μm de espessura. A coloração foi feita com azul de toluidina a 0,05% (O'Brien *et al.*, 1964) e algumas lâminas foram sequencialmente coradas com lugol (Johansen, 1940) diluído (1:3), para a detecção de amido. Secções transversais da casca fresca, obtidas em micrótomo de mesa, foram submetidas ao cloreto de ferro III (Johansen, 1940) para detecção de compostos fenólicos, sudan escarlata (Brundrett *et al.*, 1991) para lipídios e reagente de Nadi (David & Carde, 1964) para terpenos. As amostras do caule também foram maceradas em solução de Jeffrey (ácido nítrico 10%: ácido crômico 10%), lavadas em água corrente, coradas com violeta cristal e desidratadas em série etílica-xilólica. A montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Permout).

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus) equipado com sistema U-photo acoplado a microcomputador com o programa Spot-Basic. As mensurações dos elementos condutores e medidas lineares foram realizadas considerando-se a média de 100 contagens por parâmetro analisado, em microscópio de luz (Olympus CBA) acoplado à câmara clara, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram retiradas amostras do caule adulto de aproximadamente 0,25 cm², fixadas em FAA₅₀ por 24 horas, cortadas à mão-livre com navalha descartável para cortes histológicos (Leica modelo 818) em diferentes planos (transversal, longitudinal radial e longitudinal tangencial), ou maceradas em solução de Jeffrey, e estocadas em etanol 70%. Todo material foi desidratado em série etílica crescente, seco em ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec CPD 030) e fixado em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla-face. Após a metalização (Balzers SCA 010) com ouro (20 nm), as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP) a 10,6 kV do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

Resultados

Desenvolvimento inicial do caule e instalação do câmbio vascular

No início do desenvolvimento do caule (Figura 1A-B), os feixes colaterais se dispõem em anel concêntrico periférico, caracterizando a estrutura eustélica, tornando bastante distintas as regiões cortical e medular. A protoderme exibe inúmeros tricomas tectores e glandulares peltados, além de estômatos relativamente bem diferenciados (Figuras 1A, 2A, 3A). O procâmbio forma um anel contínuo e já exibe cordões de xilema e floema primários diferenciados, num estágio onde os tecidos corticais e medulares ainda estão pouco diferenciados (Figuras 1B, 2A-B). Posteriormente, a epiderme diferencia-se totalmente e perde grande parte dos tricomas (Figura 1B, 2C, 3B). A região cortical exibe algumas camadas de colênquima angular em posição sub-epidérmica, seguidas de calotas de fibras pericíclicas externas aos cordões de floema primário, e o restante da região é preenchida por parênquima clorofiliano (Figura 1B, 2C, 3B). A medula é composta por parênquima de preenchimento (Figura 1). A faixa cambial instalada é contínua, e tem atividade usual, com

produção de xilema secundário para o interior e floema secundário para o exterior (Figura 1C, 2C-E). Ainda muito precocemente, a faixa cambial passa a ter atividade não-usual em quatro pontos distintos, opostos entre si dois a dois (Figura 1D, 2F), onde há uma redução drástica da produção de xilema secundário para o interior e produção contínua de floema secundário para o exterior. A partir dessa etapa, toda a faixa cambial, usual e não-usual, passa a produzir elementos condutores de maior diâmetro. A faixa cambial passa a ser descontínua, pelo deslocamento desigual das diferentes porções do câmbio vascular, pois o câmbio com atividade usual (bifacial ou bidirecional) torna-se cada vez mais externo no caule, enquanto que as porções do câmbio com atividade não-usual (unifacial ou unidirecional) são praticamente estacionárias. Com o desenvolvimento do caule, novas porções cambiais passam a ter atividade não-usual, sempre localizadas nas laterais das faixas cambiais não-usuais anteriormente estabelecidas, e com a mesma largura, dando aspecto de degrau aos blocos de floema secundário (Figura 1E-F, 2G). O floema secundário produzido pelo câmbio não-usual desliza pelo lenho estacionário formado nas suas laterais. Como o câmbio não ocorre nas faces radiais das faixas de floema secundário não-usual, há formação de espaços conspícuos. Os quatro pontos que correspondem às porções cambiais com atividade não-usual formam blocos de floema secundário não-usual que ficam inseridos na massa xilemática. Assim, o lenho apresenta-se com o aspecto de cruz-de-Malta, em seção transversal, o que caracteriza o padrão de crescimento não-usual da espécie (Figura 1F).

Instalação do felogênio e formação da periderme

A formação do felogênio ocorre posteriormente à instalação da faixa cambial de atividade usual, a partir da desdiferenciação da primeira camada subepidérmica da região cortical, composta por células de colênquima (Figuras 2D, 3C). No início da formação da periderme, a epiderme ainda está presente em algumas regiões, acima das primeiras camadas de súber formadas (Figura 3D). O felogênio só se distingue da feloderme nessa fase pela

posição. No caule mais desenvolvido, as camadas de súber se multiplicam, assim como as camadas da feloderme, porém, o felogênio mantém sua atividade contínua, preservando toda a região cortical (Figura 3E-F). Lenticelas se formam em fases ainda precoces do desenvolvimento da periderme (Figura 3G-H), mas são pouco distintas quando o acúmulo de súber é grande (Figura 3I).

Estrutura da casca

O aspecto externo da casca é bastante irregular e com coloração marrom-acinzentada. Toda região da casca interna tem coloração avermelhada e odor característico de cravo-da-Índia (Figura 4A). Nas regiões do floema secundário usual, a casca tem aproximadamente 2,6 mm de espessura, tornando-se consideravelmente mais espessa nas regiões de floema secundário não-usual.

A periderme (Figura 4B) é formada pelo súber pluriestratificado, impregnado por suberina e lignina, felogênio de atividade contínua e feloderme pluriestratificada, e assim como o felogênio, é formada por células achatadas tangencialmente e paredes delgadas (Figura 3E-F). O córtex, que é preservado na estrutura da casca, apresenta as células mais externas com expansão tangencial e também com algumas divisões anticlinais, acompanhando o aumento do diâmetro do caule (Figuras 3E, 4B). Calotas de fibras pericíclicas e cordões do floema primário colapsados também compõem a região cortical. Há cristais aciculares nas células parenquimatosas do córtex. Tanto o floema secundário usual (Figura 4) como o floema secundário não-usual (Figura 5) participam da composição da casca.

Floema secundário usual

O sistema axial define cones com a base voltada para o câmbio vascular, estratificado em faixas de floema condutor, formado por elementos condutores e parênquima axial, e faixas de floema não condutor, compostas por fibroesclereídeos (Figura 4C-D). O sistema radial, que

se intercala com o sistema axial, forma raios mais dilatados na periferia, resultado da dilatação tangencial das células radiais mais externas (Figura 4C).

O parênquima axial (Figura 4C-F) é abundante, formado por células alongadas axialmente, de paredes delgadas e não-lignificadas. Os elementos condutores (Figura 4D) são elementos de tubo crivado com 49-117-234 μm de comprimento e 9-14-23 μm de diâmetro, escassos e reunidos em pequenos grupos inseridos nas faixas de parênquima axial. As placas crivadas geralmente são simples e pouco inclinadas, embora ocorram alguns elementos de tubo crivado com placas compostas, com número reduzido de áreas crivadas. As áreas crivadas nas paredes laterais são inconspícuas. O parênquima radial (Figura 4C-F) é formado por raios multisseriados e homogêneos, com 7-16-33 células e 192-360-699 μm de altura e 2-4-6 células e 41-87-151 μm de largura, mais dilatados em direção à periferia. Os elementos de sustentação (Figura 4C-H) são fibroesclereídeos, pois o formato das células varia de fibras curtas a formas bizarras (Figura 4G-H), com 301-656-1.000 μm de comprimento e 9-15-24 μm de diâmetro. Os fibroesclereídeos estão organizados em faixas, com duas a cinco camadas de células, que se alternam com faixas de floema condutor. Há cristais aciculares nas células do parênquima axila e radial. Compostos fenólicos e gotículas lipídicas também ocorrem nas células parenquimatosas do floema secundário usual.

Floema secundário não-usual

A organização em faixas tangenciais condutoras e não-condutoras é bastante clara (Figura 5A). Faixas não-condutoras são formadas apenas por fibras e alternam-se com faixas condutoras compostas por elementos condutores abundantes e conspícuos, parênquima axial e fibras.

O parênquima axial (Figura 5A-B) é escasso e estreitamente associado aos elementos condutores. As células têm diâmetro reduzido e são alongadas axialmente. Os elementos de tubo crivado estão organizados em faixas tangenciais (Figura 5A, C), são muito conspícuos,

com 178-328-535 μm de comprimento e 21-29-41 μm de diâmetro. As placas crivadas (Figura 5D-F) são compostas, com 14-25-49 áreas crivadas por placa, e acentuadamente oblíquas. Ocorrem áreas crivadas inconspícuas nas paredes laterais. Os raios (Figura 5A) são unisseriados, homogêneos e muito freqüentes, com 4-7-11 células e 671-1.009-1.466 μm de altura e 27-38-55 μm de largura. Nas laterais de cada faixa de floema não-usual formam-se células parequimáticas alongadas radialmente, semelhantes a raios. As fibras (Figura 5A-C) predominam nas faixas tangenciais onde ocorrem de forma exclusiva, formando duas a três camadas, mas também estão presentes nas faixas que contêm os elementos condutores. As fibras têm 726-1.361-2.110 μm de comprimento e 14-27-41 μm de diâmetro. Há cristais aciculares nas células do parênquima axial e radial. São encontrados os mesmos compostos orgânicos que no floema usual, porém em menor quantidade, uma vez que as células parenquimatosas do floema secundário não-usual são mais escassas.

Lenho

O lenho todo é amarelado (Figura 6A-B) e apenas uma pequena massa de xilema secundário usual (Figura 6A) delimita a região medular, que se distingue do restante do lenho por apresentar abundância de fibras e elementos de vasos escassos com diâmetro reduzido.

No xilema secundário não-usual (Figura 6B-G, 7), os vasos são solitários, dispostos em camadas tangenciais concêntricas (Figura 6B-D). Há predomínio de elementos de vaso grandes, onde o diâmetro ultrapassa o comprimento (137-270-411 μm de diâmetro por 68-143-233 μm de comprimento), visíveis à vista desarmada, entremeados com vasos pequenos, onde o comprimento é superior ao diâmetro (116-193-329 μm de comprimento por 27-52-110 μm de diâmetro). As placas de perfuração são simples (Figura 6G, 7), localizadas em paredes terminais planas, nos elementos de vaso grandes (Figura 7D). Os elementos de vaso pequenos têm as paredes terminais muito inclinadas, formando extensões (“tails”), e as placas de perfuração ocorrem em diferentes pontos (Figura 7E). As pontoações intervasculares são

areoladas, alternadas, e apenas algumas porções das paredes podem apresentar padrão de espessamento reticulado (Figura 7A-B). Há vasta ocorrência de tiloses obstruindo total ou parcialmente vasos de grande diâmetro (Figura 6A-D, F-G). O parênquima axial é do tipo em faixas (Figura 6C), com células de paredes relativamente espessas e pontoações simples conspícuas (Figura 7C). As fibras dispõem-se em faixas tangenciais estreitas, alternadas com faixas ricas em vasos e parênquima axial (Figura 6C). As fibras têm 562-958-1.370 μm de comprimento por 14-20-34 μm de diâmetro, e as paredes secundárias são espessas e lignificadas, com pontoações simples discretas (Figura 7C-E). Os raios geralmente são homogêneos e multisseriados (Figura 6C-F), com 11-24-40 células e 123-260-548 μm de altura e 1-3-4 células e 14-39-82 μm de diâmetro. As paredes secundárias do raio são lignificadas e apresentam pontoações simples conspícuas (Figura 7C). Não há cristais ou depósitos de sílica no lenho.

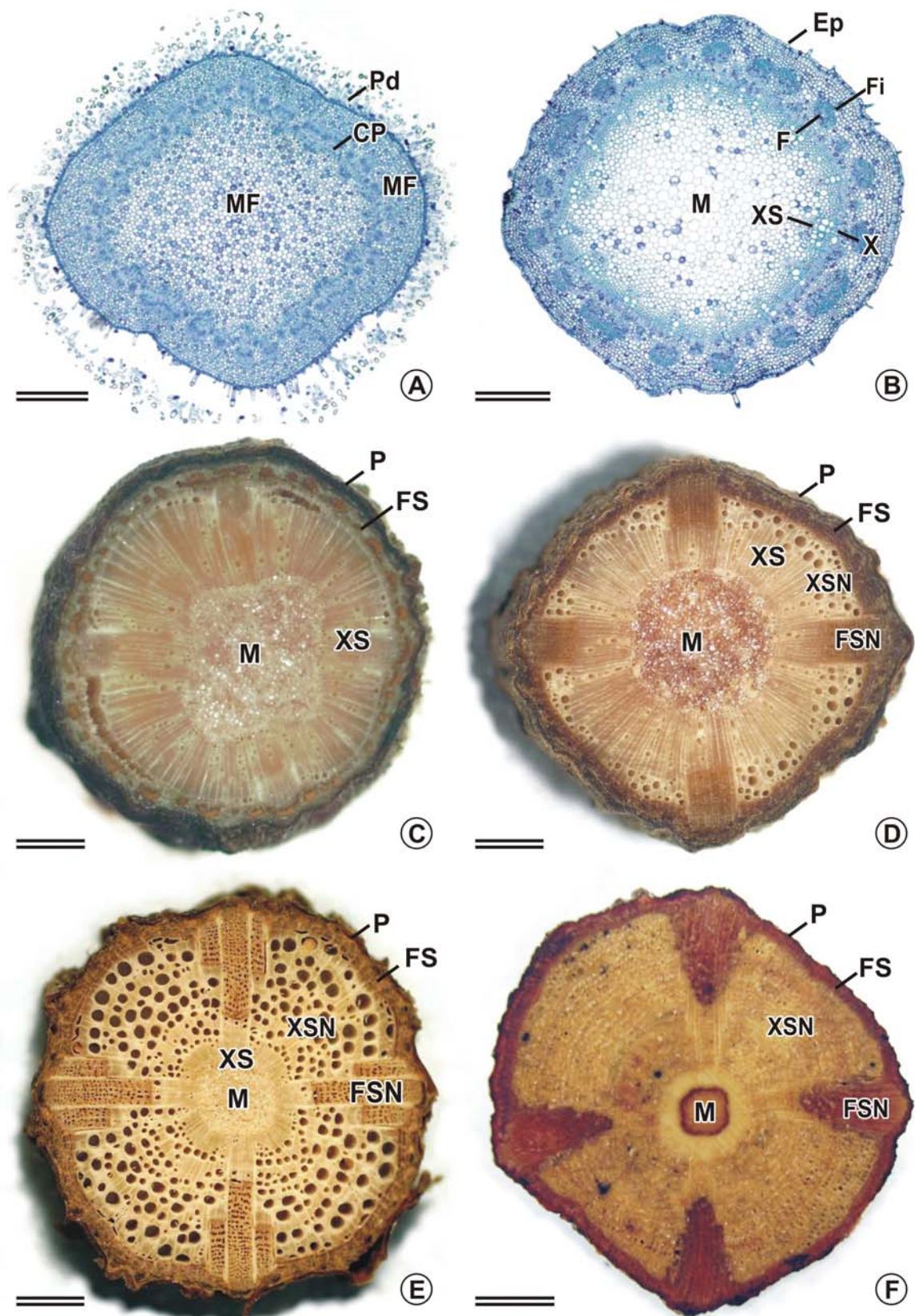


Figura 1. Seções transversais do caule de *Tynanthus fasciculatus* em diferentes estádios de desenvolvimento. A, fase meristemática. B, crescimento primário estabelecido e início de crescimento secundário. C, crescimento secundário usual (inicial). D-F, crescimento secundário não-usual. CP, cordões procambiais; Ep, epiderme; F, floema primário; Fi, fibras pericíclicas; FS, floema secundário usual; FSN, floema secundário não-usual; M, medula; MF, meristema fundamental; P, periderme; Pd, protoderme; X, xilema primário; XS, xilema secundário usual; XSN, xilema secundário não-usual. Barras: A-B= 300 μm; C= 500 μm; D-E=1000 μm; F =5000 μm.

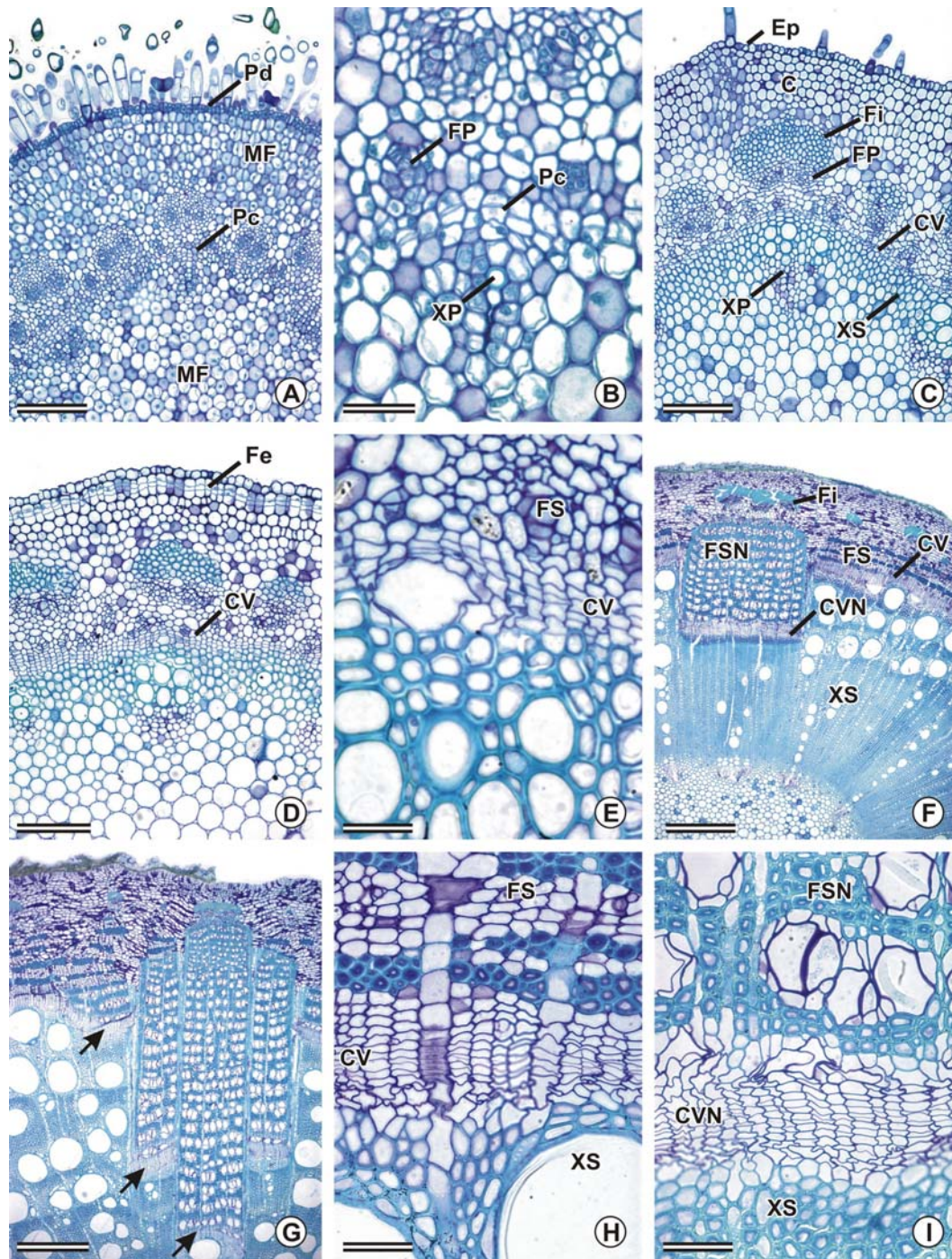


Figura 2. Seções transversais do caule de *Tynanthus fasciculatus* em diferentes estádios de desenvolvimento. A, transição entre a fase meristemática e a estrutura primária. B, detalhe da figura anterior. Notar que apenas alguns elementos floemáticos e de protoxilema estão diferenciados e a atividade cambial já se inicia. C, caule já diferenciado, com a região cortical em estrutura primária e câmbio vascular produzindo xilema e floema secundários. D, formação do felogênio. E, detalhe da figura anterior onde se observa câmbio vascular ainda com atividade usual. F-G, caule com crescimento secundário não-usual. Setas indicam acréscimo de câmbio vascular não-usual. H-I, detalhes da figura G. H, câmbio vascular com atividade usual e produção de xilema secundário para o interior e floema secundário para o exterior. I, câmbio vascular com atividade não-usual e produção de floema secundário não-usual para o exterior e pequena quantidade de xilema secundário para o interior. C, colênquima; CV, câmbio vascular; CVN, câmbio vascular não-usual; Ep, epiderme; Fi, fibras pericíclicas; FP, floema primário; FS, floema secundário; FSN, floema secundário não-usual; MF, meristema fundamental; Pc, procâmbio; Pd, protoderme; XP, xilema primário; XS, xilema secundário. Barras: A, C-D= 100 μ m; B, E =25 μ m; F-G= 500 μ m; H-I= 50 μ m.

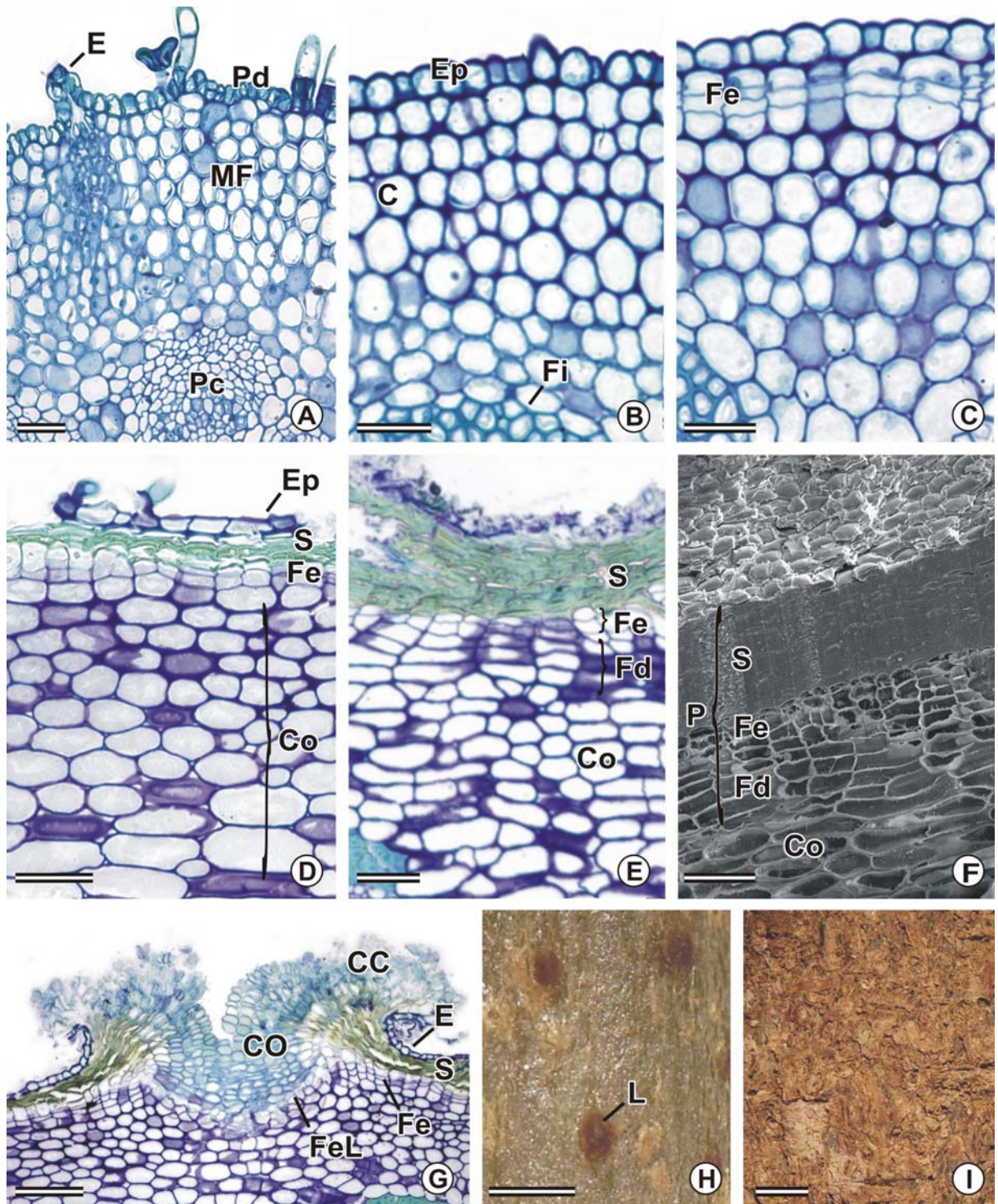


Figura 3. Seções transversais do caule (A-G) e aspecto externo da casca (H-I) de *Tynanthus fasciculatus*. A, protoderme com estômatos já diferenciados e região cortical ainda em diferenciação. B, região epidérmica e cortical já diferenciadas. C, formação do felogênio a partir da primeira camada subepidérmica. D, camadas de súber já diferenciadas e epiderme sendo eliminada. E-F, grande quantidade de súber e feloderme compondo a periderme. G, lenticela. H, caule jovem. I, caule adulto. C, colênquima; CC, célula de cobertura; Co, córtex; CO, célula de oclusão; E, estômato; Ep, epiderme; Fd, feloderme; Fe, felogênio; FeL, felogênio da lenticela; Fi, fibra pericíclica; L, lenticela; MF, meristema fundamental; P, periderme; Pc, procâmbio; Pd, protoderme; S, súber. Barras: A-C= 25 µm; D-F= 50 µm; G= 100 µm; H= 1000 µm; I= 2000 µm.

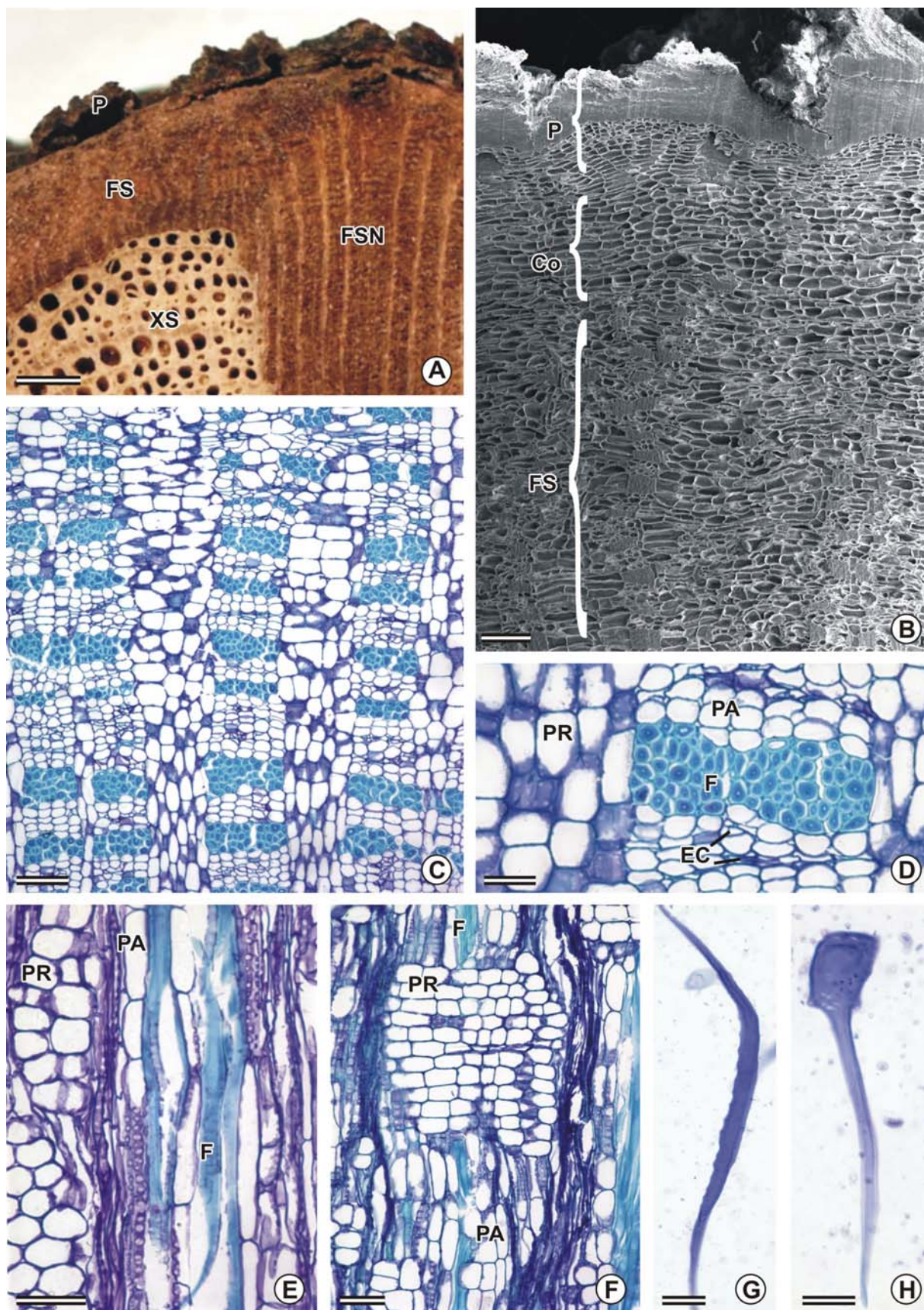


Figura 4. Aspecto geral da casca (A-B) e do floema secundário usual (C-H). A-D, seções transversais. E-F, seções longitudinais tangencial (E) e radial (F). G-H, macerado com detalhe de esclereídeos fibriformes. Co, córtex; EC, elemento de tubo crivado; F, fibroesclereídeo; FS, floema secundário usual; FSN, floema secundário não-usual; P, periderme; PA, parênquima axial; PR, parênquima radial; XS, xilema secundário. Barras: A= 1000 μ m; B-C= 100 μ m; D-G= 50 μ m; H=25 μ m.

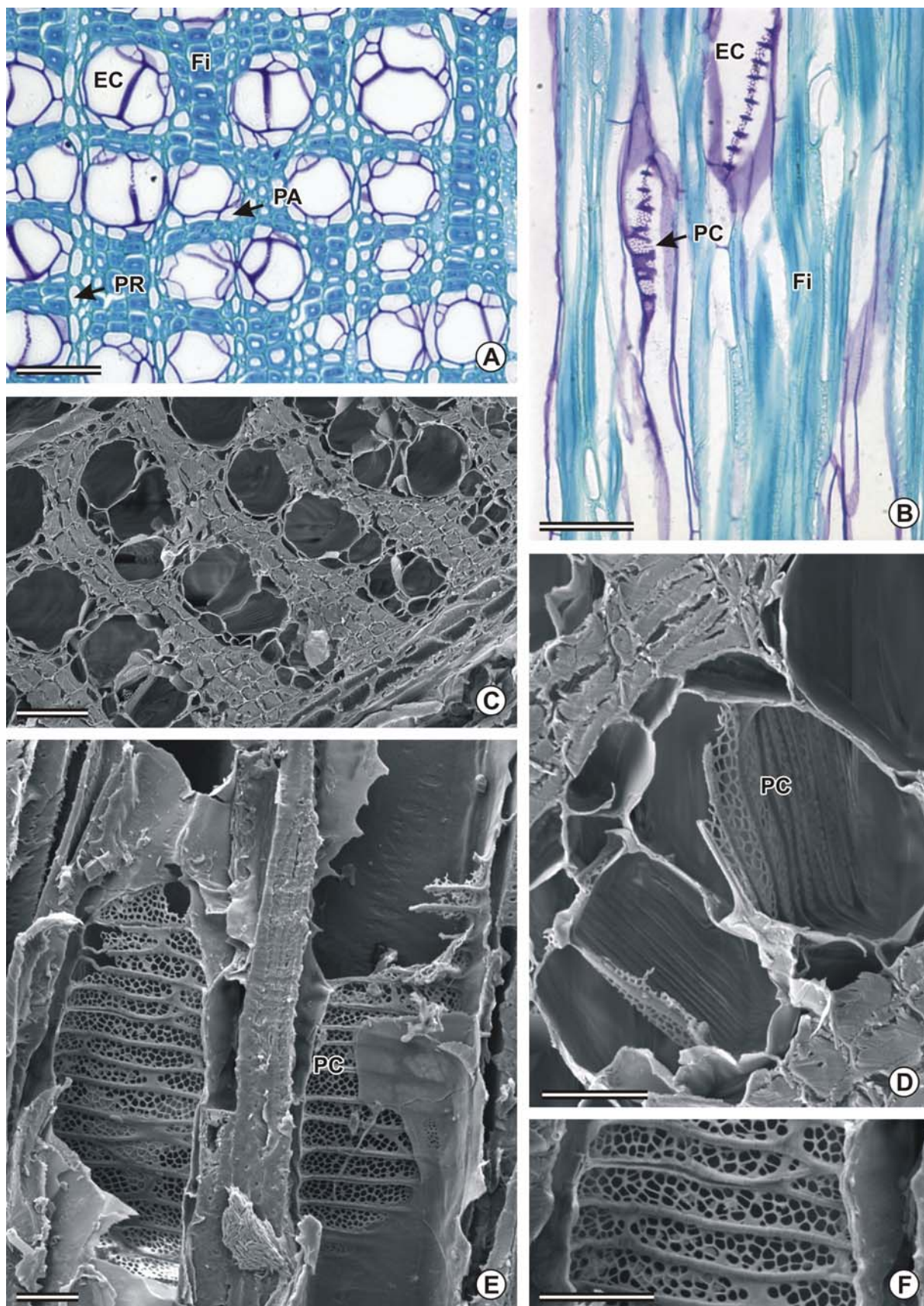


Figura 5. Seções transversais (A, C-D) e longitudinais tangencial (B) e radial (E-F) do floema secundário não-usual do caule de *Tynanthus fasciculatus*. E-F, detalhe das placas crivadas compostas. EC, elemento de tubo crivado; Fi, fibra; PA, parênquima axial; PC, placa crivada composta; PR, parênquima radial. Barras: A-C= 50 μ m; D-F =25 μ m.

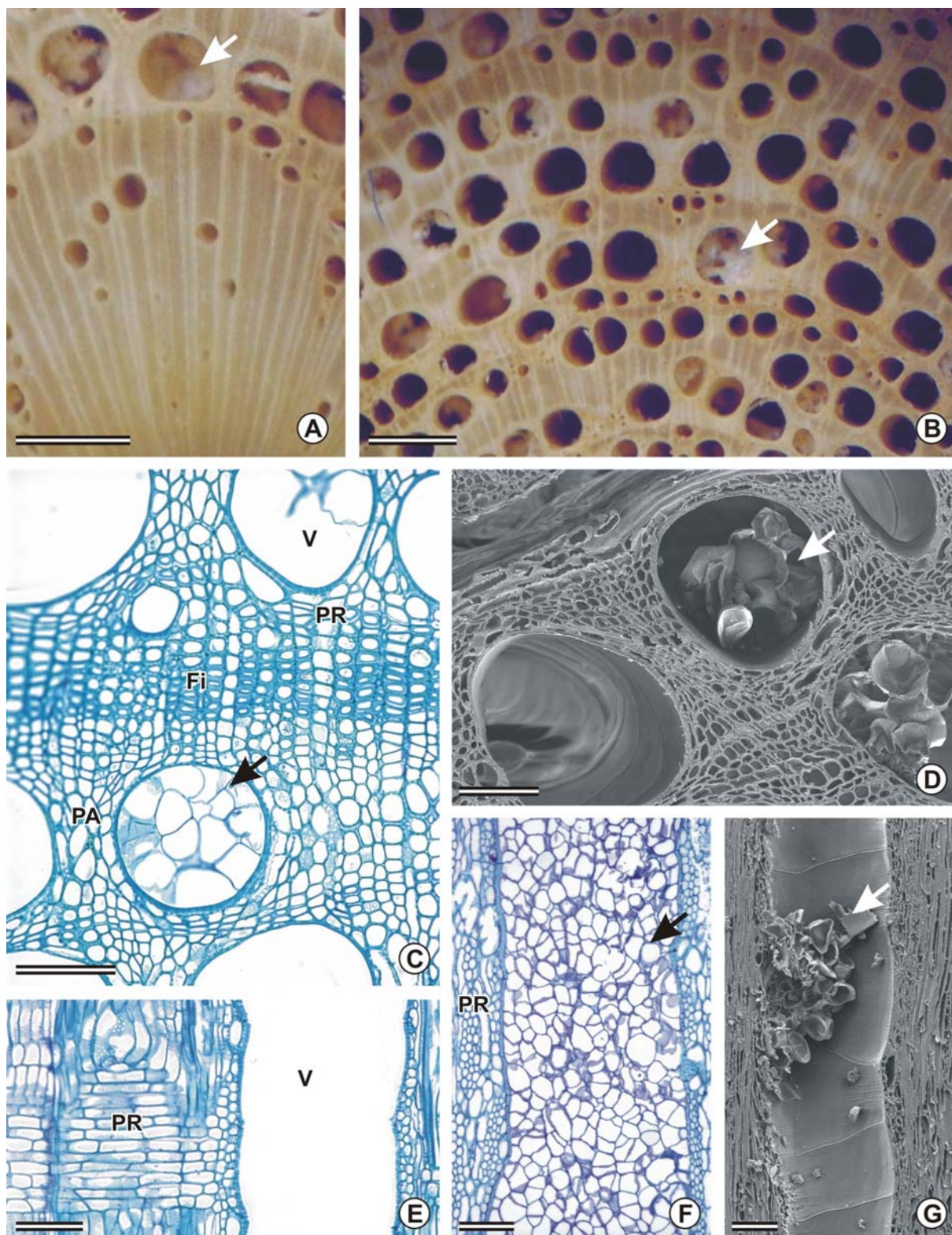


Figura 6. Seções transversais (A-D) e longitudinais radial (E) e tangencial (F-G) do lenho do caule de *Tynanthus fasciculatus*. A, próximo à medula, resultado da fase de crescimento secundário usual. B, região mais externa, resultante do crescimento secundário não-usual. C-D, F-G, vasos obliterados por tilose. E, vaso sem tilose. As setas presentes indicam tiloses nos vasos. Fi, fibra; PA, parênquima axial; PR, parênquima radial; V, vaso. Barras: A-B= 500 μ m; C-G =100 μ m.

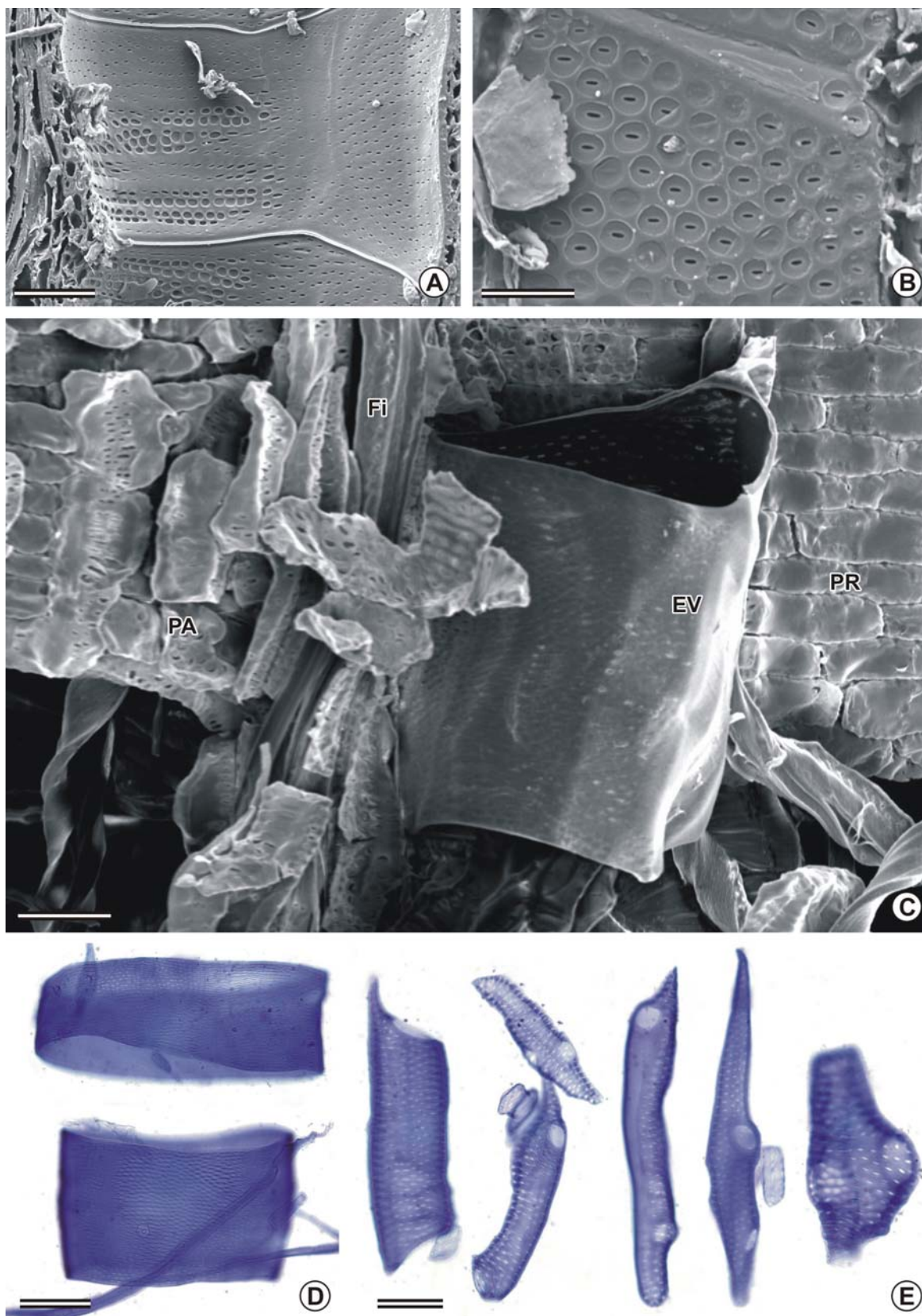


Figura 7. Seções longitudinais tangenciais (A-B) e macerados (C-E) do lenho do caule de *Tynanthus fasciculatus*. A, elementos de vaso com espessamento da parede secundária parcialmente reticulado. B, elemento de vaso com pontoações areoladas. C, elemento de vaso, fibras e parênquima radial e axial, mantendo parcialmente a organização estrutural. D, elementos de vaso grandes. E, elementos de vaso pequenos com placas de perfuração em diferentes posições. EV, elemento de vaso; Fi, fibra; PA, parênquima axial; PR, parênquima radial. Barras: A= 50 μm ; B =20 μm ; C= 30 μm ; D= 100 μm ; E= 50 μm .

Discussão

O padrão de crescimento secundário não-usual é comum em lianas de diversas famílias botânicas (Boureau & Troisième, 1957; Metcalfe & Chalk, 1957; Caballé, 1993; Araújo & Costa, 2007). Este padrão de desenvolvimento pode estar relacionado ao hábito trepador, provavelmente proporcionando vantagens adaptativas como o aumento da flexibilidade do caule sem danos aos elementos condutores e facilidade na escalada da planta (Fahn, 1989; Dickison, 2000). Vários autores descreveram o padrão de crescimento não-usual que ocorre no gênero *Tynanthus* e em outros gêneros de Bignoniaceae, como *Amphilophium*, *Clytostoma*, *Peltastoma* e *Pyrostegia* (Gabrielli, 1993; Mauseth, 1988; Dickison, 2000), denominado de tipo “cunha de floema inserida no xilema” (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1957), onde o lenho adquire o aspecto de cruz-de-Malta. Boureau & Troisième (1957) denominam este padrão de crescimento secundário como “tipo interrompido”. O câmbio se tornaria unidirecional em quatro setores, produzindo apenas floema secundário para o exterior e cessando a produção de xilema secundário para o interior, e o restante da faixa cambial continuaria a produzir xilema secundário para o interior, normalmente (Solereder, 1908; Boureau & Troisième, 1957; Metcalfe & Chalk, 1957; Dickison, 2000; Mauseth, 1988). Segundo Dobbins (1981), a posição das faixas de câmbio unidirecional em caule de Bignoniaceae está correlacionada com o padrão vascular.

Em *T. fasciculatus* percebe-se que a mudança da atividade cambial é qualitativa na medida em que o floema secundário formado nessas faixas do câmbio é estruturalmente diferente, com menor quantidade de parênquima axial e radial, mais fibras e elementos de tubo crivado com maior diâmetro. O xilema secundário não-usual também exhibe padrão anatômico distinto do xilema secundário usual. A mudança na atividade cambial também pode ser considerada quantitativa, uma vez que a produção de xilema secundário nas faixas cambiais ditas “unidirecionais” apenas diminui, mas não cessa totalmente durante o

desenvolvimento do caule. Isso pode ser verificado pelo distanciamento das cunhas de floema secundário imersas no lenho em relação à medula, com o desenvolvimento do órgão.

A origem do felogênio no caule de *T. fasciculatus* segue o padrão mais comum encontrado em caules de espécies lenhosas, a partir de camadas subepidérmicas corticais, embora, em outras taxa, possa ter origem a partir de regiões mais internas do córtex e até mesmo do floema secundário (Dickison, 2000). Em *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), por exemplo, o felogênio origina-se pela desdiferenciação de células parenquimáticas do floema, situadas sob cordões de esclerênquima, e prossegue próximo e paralelo à epiderme (Gabrielli, 1993). No caso do caule de *P. venusta* a região cortical não é preservada, como ocorre em *T. fasciculatus*. Como não há formação de ritidoma em *T. fasciculatus*, o único felogênio formado tem atividade contínua, mantendo os tecidos internos (tecidos corticais, floema primário e floema secundário não ativos) na estrutura da casca e acumulando compostos.

Para um grande número de espécies consideradas medicinais, a casca é a parte utilizada como droga (Ming *et al.*, 1997), e além da periderme, inclui todos os tecidos externos ao câmbio vascular (Dickison, 2000). Muitas Bignoniaceae lianescetes possuem importância etnobotânica e fazem parte de farmacopéias de diferentes países, e características da casca, como presença e tipo de lenticelas, nuances de textura, coloração e cheiro, podem auxiliar no reconhecimento no campo (Gentry, 1980). O floema secundário, que é rico em células parenquimatosas, é quantitativamente bem representado na casca de *T. fasciculatus*, portanto, tem grande importância na síntese e acúmulo de compostos fenólicos e substâncias lipídicas como terpenos, na casca desta espécie.

Em *T. fasciculatus*, é nítida a dilatação dos raios do floema secundário à medida que se distanciam do câmbio vascular. Essa dilatação é característica da formação do tecido de expansão (Mauseth, 1988), com reativação da citocinese e expansão tangencial das células do parênquima radial. Na maioria das espécies, apenas o incremento mais recente do floema é funcional (Dickison, 2000), e a maior parte dos elementos condutores do floema não-ativo

estão colapsadas (Mauseth, 1988). Durante o crescimento secundário, o floema mais velho é deslocado pela atividade do câmbio e sujeito a estresses tangenciais resultantes do crescimento do caule em diâmetro, causando deformação e até colapso de células.

A abundância e o padrão de distribuição das fibras do floema secundário são característicos para determinados taxa. Porém, a classificação das fibras do floema não têm sido satisfatória, tanto por sua origem diversa como por sua intergradação com esclereídeos (Dickison, 2000). Em *T. fasciculatus*, as células de sustentação do floema secundário usual podem ser consideradas como fibroesclereídeos, pela morfologia intermediária entre fibras e esclereídeos. Em *Styrax camporum*, grupos de células do floema secundário, alongadas axialmente e semelhantes a fibras são descritas como células esclerificadas (Machado *et al.*, 2005). Nesta espécie, fibras associadas a esclereídeos foram encontradas apenas na casca da raiz, e células esclerificadas associadas a esclereídeos na casca do caule (Machado *et al.*, 2005). Isso sugere que as células esclerificadas constituem uma característica derivada, uma vez que a raiz conserva características mais ancestrais que a parte aérea.

T. fasciculatus não apresenta marcadores de crescimento evidentes no lenho, porém, as faixas tangenciais de fibras que se alternam com os demais elementos celulares sugerem uma repetição da atividade cambial em determinados intervalos de tempo. A presença de anéis ou marcadores de crescimento é uma tendência em madeiras brasileiras, e são mais frequentes em altas altitudes e em ambientes com forte sazonalidade de temperatura (Alves & Angyalossy-Alfonso, 2000). As placas de perfuração simples, como as que ocorrem nos elementos de vaso de *T. fasciculatus*, também constituem uma tendência em madeiras brasileiras (Alves & Angyalossy-Alfonso, 2000) e em áreas tropicais de baixa altitude (Dickison, 2000).

O diâmetro dos vasos, de modo geral, parece estar relacionado às condições do habitat da espécie, como altitude, latitude e disponibilidade de água (Metcalfé & Chalk, 1989). Vasos com maior diâmetro são predominantes em áreas tropicais de baixa latitude, enquanto

vasos com menor diâmetro são mais frequentes em habitats xéricos, temperados ou montanhosos frios (Dickison, 2000). Vasos grandes e pequenos se alternam no lenho de *T. fasciculatus*, e podem estar relacionados à eficiência e segurança hidráulica em períodos de escassez e abundância de água, que caracteriza o ciclo climático anual na região de ocorrência da espécie. Na espécie arbórea *Schizolobium parahyba*, durante a atividade cambial máxima (estação úmida e presença de folhas) há formação de vasos mais largos e fibras com paredes delgadas, e durante a atividade cambial mínima (seca e queda de folhas) formam-se elementos de vaso pequenos e fibras de paredes espessas e achatadas radialmente, adjacentes ao câmbio (Marcati *et al.*, 2008). Leon-Gomes & Monroy-Ata (2005) estudaram a atividade cambial anual de quatro lianas de uma floresta tropical de baixa altitude; embora o diâmetro dos vasos não tenha sido avaliado, foi demonstrado que a atividade cambial também é maior em períodos chuvosos na maioria das espécies estudadas.

As tiloses são muito comuns e abundantes no lenho de *T. fasciculatus*, e se caracterizam pela projeção do protoplasto de células parenquimatosas vivas adjacentes, que penetram no lume dos vasos pelas pontuações (Mauseth, 1988; Fahn, 1989; Metcalfe & Chalk, 1989; Evert, 2006; Agrios, 2004). Em alguns casos, as tiloses podem ter espessamento de parede e lignificação (Evert, 2006), o que não ocorre em *T. fasciculatus*. As tiloses podem causar obstrução parcial ou total, reduzindo ou cessando totalmente o fluxo no vaso (Metcalfe & Chalk, 1989). Em algumas madeiras, as tiloses são formadas quando cessa o funcionamento do vaso (Fahn, 1989; Evert, 2006) e, na maioria das plantas, são formadas prematuramente por diversas condições de estresse e invasão de patógenos (Mauseth, 1988; Fahn, 1989; Agrios, 2004; Evert, 2006). Metcalfe & Chalk (1989) destacam o valor diagnóstico das tiloses, pela ocorrência esporádica ou restrita a determinadas famílias, como Bignoniaceae, por exemplo.

O parênquima axial paratraqueal, como ocorre em *T. fasciculatus*, além de raios estreitos e fibras com paredes mais espessas são considerados características comuns em

espécies lenhosas de baixas latitudes, com nas regiões tropicais (Alves & Angyalossy-Alfonso, 2002).

Conclusões

A caracterização estrutural do caule de *T. fasciculatus* fornece subsídios para a identificação de estruturas vegetativas e acrescentam dados à monografia já existente na Farmacopéia Brasileira.

Referências Bibliográficas

- Agrios GN. 2004.** *Plant Pathology*. 5.ed. New York: Elsevier Academic Press.
- Alves ES, Angyalossy-Alfonso V. 2000.** Ecological trends in the wood anatomy of some brazilian species. 1. Growth rings and vessels. *IAWA Journal* **21**(1): 3-30.
- Alves ES, Angyalossy-Alfonso V. 2002.** Ecological trends in the wood anatomy of some brazilian species. 2. Axial parenchyma, rays and fibers. *IAWA Journal* **23**(4): 391-418.
- Araújo GUC, Costa CG. 2007.** Anatomia do caule de *Serjania corrugata* Radlk. (Sapindaceae). *Acta Botanica Brasilica*. **21**(2):489-497.
- Barroso GM, Peixoto AL, Costa CG, Ichaso CLF, Guimarães EF, Lima HC de. 1991.** *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária. v.3.
- Botsaris AS, Machado PV. 1999.** Memento Terapêutico. *Flora Medicinal*
- Boureau E, Troisième T. 1957.** *Anatomie végétale L'appareil végétatif des Phanérogames*. Paris: Press Universitaires de France. 633-651.

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechninc & Histochemistry* **66**: 111-116.
- Cabballé G. 1993.** Liana structure, function and selection: a comparative study of xylem cylinders of tropical rainforest species in Africa and America. *Botanical Journal of the Linnean Society* **113**: 41-60.
- Carlquist S. 1982.** The use of ethylenediamine in softening hard plant structures for paraffin sectioning. *Stain Technology* **57**(5):311-317.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de I'Academie dès Sciences Paris* **258**: 1338-1340.
- Dickison WC. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Academic Press.
- Dobbins DR. 1981.** Anomalous secondary growth in lianas of the Bignoniaceae is correlated with the vascular pattern. *American Journal of Botany* **68**(1): 142-144.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy*. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A. 1989.** *Plant Anatomy*. 3.ed. Oxford: Pergamon Press.
- Farmacopéia Brasileira. 1959.** 2.ed. São Paulo: Siqueira.
- Gabrielli AC. 1993.** Estrutura caulinar secundária em *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers – Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **16**(2): 167-173.
- Gentry AH. 1974.** Coevolutionary patterns in central american Bignoniaceae. *Annals Missouri Botanical Garden* **61**: 728-759.
- Gentry AH. 1980.** *Bignoniaceae – Part I (Crescentieae and Tourrettieae)*. *Flora Neotropica* 25. New York: The New York Botanical Garden.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Book Co.

- Léon-Gómez C, Monroy-Ata A. 2005.** Seasonality in cambial activity of four lianas from a mexican lowland tropical rainforest. *IAWA Journal* **26**(1): 111-120.
- Machado SR, Marcati CR, Morretes BL, Angyalossy V. 2005.** Comparative bark anatomy of root and stem in *Styrax camporum* (Styracaceae). *IAWA Journal* **26**(4):477-487.
- Marcati CR, Milanez CRD, Machado SR. 2008.** Seazonal development of secondary xylem and phoem in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Trees* **22**:3-12.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy, 4.ed.* California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Mendes FR, Carlini EA. 2007.** Brazilian plants as possible adaptogen: an ethnopharmacology survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 493-500.
- Metcalf CR, Chalk L. 1957.** *Anatomy of the dicotyledons.* Oxford: Oxford University Press, v. 2.
- Metcalf CR, Chalk L. 1989.** *Anatomy of the Dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction.* 2.ed. Oxford: Claredon Press.
- Ming LC, Gaudêncio P, Santos VP dos. 1997.** *Plantas medicinais: uso popular na reserva extrativista “Chico Mendes”, Acre.* Botucatu: CEPLAM, UNESP.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Solereder H. 1908.** *Systematic anatomy of the dicotyledons.* Oxford: Claredom Press. v.1.
- Vianello, R.L, Alves, A.R. 1991.** *Meteorologia básica e aplicações.* Viçosa: Editora da UFV.

CAPÍTULO 2

Histoquímica e prospecção fitoquímica da casca do caule de *Tynanthus fasciculatus*

Miers (Bignoniaceae)

RESUMO – *Tynanthus fasciculatus* Miers, é uma Bignoniaceae lianescente, conhecida como cipó-cravo, cuja casca é utilizada na medicina tradicional. O objetivo do presente trabalho foi correlacionar a estrutura anatômica da casca do caule de *T. fasciculatus* com a presença de grupos químicos de interesse farmacológico, utilizando técnicas de microscopia de luz e de prospecção fitoquímica. Para a análise estrutural, amostras do caule foram fixadas em FAA₅₀, estocadas em etanol 70%, amolecidas em etilenodiamina, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato. O material foi seccionado transversal e longitudinalmente (5µm) em micrótomo rotativo. Para a análise histoquímica, porções frescas da casca foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa e submetidas a diversos corantes e reagentes. Para a prospecção fitoquímica, extratos hexânico e metanólico da casca foram obtidos empregando aparelho de Soxhlet e submetidos ao estudo por cromatografia de camada delgada (CCD). Os principais grupos de metabólitos identificados por ambas as técnicas foram compostos fenólicos como taninos e flavonóides, alcalóides e terpenos, todos localizados nas células parenquimatosas da casca e do floema secundário inserido na massa xilemática. Os taninos e cumarinas foram identificados apenas por CCD. A presença desses metabólitos secundários nas células parenquimatosas da casca do caule pode estar correlacionada com o potencial terapêutico da espécie e o uso da casca como insumo para a produção de fitoterápicos. A indicação e descrição das técnicas para análise dos principais grupos de metabólitos secundários, presentes na casca do caule de *T. fasciculatus*, também são uma ferramenta para o controle de qualidade da droga vegetal.

Introdução

Tynanthus fasciculatus Miers (Bignoniaceae), popularmente conhecido como cipó-cravo, é uma liana nativa do Brasil, com ocorrência na Mata Atlântica dos estados de São Paulo e Minas Gerais (Gentry, 1992). A espécie é utilizada como planta medicinal por comunidades tradicionais e diferentes usos etnofarmacológicos são atribuídos a essa espécie, como tônico estomacal, carminativo, aromático (Botsaris & Machado, 1995), contra má digestão (Ming *et al.*, 1997), afrodisíaco (Botsaris & Machado, 1995; Mendes & Carlini, 2007) e tônico restaurador (Mendes & Carlini, 2007). Há referências sobre a utilização terapêutica da planta inteira, da casca da raiz (Mendes & Carlini, 2007) ou da casca do caule, utilizadas popularmente nas formas de chás (Muñoz *et al.*, 2000) e garrafadas (Amorim *et al.*, 1994; Ming *et al.*, 1997). A Farmacopéia Brasileira (1959) indica o caule na descrição macroscópica dessa droga vegetal, sendo esta rica em óleos essenciais, glicosídeos, alcalóides e taninos (Botsaris & Machado, 1995). O mesmo possui odor suave, semelhante ao do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) que, associado ao hábito trepador, justifica o nome comum da espécie. Caules do gênero *Tynanthus* são reconhecidos macroscopicamente pela seção transversal levemente quadrangular e o lenho em forma de cruz-de-Malta, decorrente do padrão de crescimento secundário não-usual (Boureau & Troisieme, 1957; Metcalfe & Chalk, 1950).

Outras espécies do gênero, como *T. elegans*, são também conhecidas popularmente como cipó-cravo (Muñoz *et al.*, 2000; Bourdy *et al.*, 2000; Mendes & Carlini, 2007), o que dificulta a correta identificação dessas espécies. Assim, embora a literatura já tenha dados gerais sobre a anatomia e a presença de metabólitos secundários em *T. fasciculatus*, os estudos sobre essa espécie ainda são escassos. A identificação correta da droga, como também indicação da localização dos sítios de biossíntese de metabólitos de interesse, estão

condicionadas a estudos mais detalhados sobre aspectos anatômicos, histoquímicos e fitoquímicos.

Este trabalho tem como objetivo relacionar a estrutura anatômica da casca do caule de *T. fasciculatus* com a presença de grupos químicos de interesse farmacológico, utilizando técnicas de microscopia de luz e de prospecção fitoquímica.

Material e Métodos

Material vegetal

As cascas do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae), com 2 a 4 cm de diâmetro, já lenhosos, de três indivíduos, foram coletadas na mata da Silvicultura do *Campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

Microscopia de Luz

As análises em microscopia de luz foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Avaliação estrutural. O material foi fixado em FAA₅₀, por 48 horas, e conservado em etanol 70% (Johansen, 1940). Seções transversais do caule foram observadas e fotografadas em estereomicroscópio (Stemi 2000-C, Zeiss) com câmera digital (D-535, Olympus). O seccionamento do caule foi realizado em micrótomo de deslize (SM 2000R, Leica). Porções da casca com aproximadamente 25 μm^2 , foram amolecidas em etilenodiamina 40%, por 30 dias (Carlquist, 1982) e posteriormente desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), conforme as recomendações do fabricante. Seções transversais e longitudinais tangenciais e radiais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica), com 5 μm de espessura. A coloração foi feita com azul

de toluidina a 0,05% pH 4 (O'Brien *et al.*, 1964) e algumas lâminas foram sequencialmente coradas com reagente de lugol (Johansen, 1940), para a detecção de amido. A montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Permout).

Avaliação histoquímica. Amostras da casca, frescas ou armazenadas em congelador, foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa (modelo LPC - Rolemberg & Bhering) ou em criomicrotomo (modelo CM1850, Leica). O material seccionado foi submetido a diferentes corantes/ reagentes: sudan vermelho escarlata (Brundrett *et al.*, 1991) e sudan black B (Pearse, 1980) para lipídios, sulfato azul do Nilo (Cain, 1947) para lipídios ácidos e neutros, reagente de Nadi (David & Carde, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas, cloreto de ferro III (Johansen, 1940) e dicromato de potássio (Gabe, 1968) para compostos fenólicos, vanilina clorídrica (Mace & Howell, 1974) para taninos, floroglucina (Jensen, 1962) para lignina, reagente de Wagner e reagente de Dittmar (Furr & Mahlberg, 1981) para alcalóides, vermelho de Rutênio (Johansen, 1940) para substâncias pécticas e xilidine ponceau (Vidal, 1977) para proteínas totais. Os controles foram conduzidos paralelamente aos testes utilizados.

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus) equipado com sistema U-photo e acoplado a microcomputador com o programa Spot-Basic.

Prospecção fitoquímica

As análises foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. As cascas de *T. fasciculatus* foram secas em estufa a 35°C e pulverizadas em moinho de faca (Tecna). A partir de 20 g de cascas secas pulverizadas foram preparados, empregando o aparelho de Soxhlet, os extratos hexânico (a 40°C/ 6 horas) e metanólico (a 60°C/ 6 horas). Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão em evaporador rotatório (Modelo Büchi R-200) e reservados para análise.

Os testes de prospecção fitoquímica realizados por cromatografia em camada delgada (CCD) avaliaram a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: cumarinas, flavonóides, antraquinonas, taninos, óleos essenciais, alcalóides, triterpenos/esteróides e glicosídeos cardiotônicos. Para a revelação dos cromatogramas foram usados reagentes específicos para cada grupo de metabólitos secundários e observação em câmara escura nas regiões de luz UV em 254 e a 365 nm. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel GF₂₅₄ (Merk ®), diferentes fases móveis e reagentes reveladores (Tabela 1), de acordo com o método descrito por Wagner *et al.* (1984). Na análise cromatográfica, para cada classe, foram utilizados padrões de marcadores químicos como referência.

Tabela 1. Condições cromatográficas para a prospecção fitoquímica selecionadas para os extratos metanólico e hexânico de *T. fasciculatus*

Metabólitos secundários	Mistura eluente	Revelador
Extrato metanólico		
Cumarinas	tolueno/éter (1:1)	solução etanólica de KOH a 5% sob luz UV ₂₅₄
Flavonóide	acetato etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:27)	solução etanólica de AlCl ₃ hexahidratada a 5% sob luz UV ₃₆₅
Antraquinona	acetato etila/metanol/água (50:8,5:6,5)	solução etanólica de KOH a 5%
Taninos	tolueno/butanol/ácido acético/água (50:25:25:5)	mistura de soluções aquosas de K ₃ Fe(CN) ₆ a 1% (A) e de FeCl ₃ a 2% (B) Solução A e B (1:1)
Alcalóide	acetato etila/ácido fórmico/ácido acético glacial (50:5,5:5,5)	reagente de Drangendorff
Saponinas	clorofórmio/metanol/água (64:50:10)	reagente de anisaldeído e ácido sulfúrico
Heterosídeo Cardiotônico	acetato etila/metanol/água (81:11:8)	reagente de Kedde
Extrato hexânico		
Óleo essencial	tolueno/acetato de etila (93:7)	reagente de anisaldeído e ácido sulfúrico
Terpenos/ Esteróides	hexano/acetato etila (70:30)	Reagente de Lieberman Burchard

Resultados

Caracterização estrutural. O caule de *T. fasciculatus*, já lenhoso, tem seção transversal levemente quadrangular e aspecto característico de cruz-de-Malta, resultado do crescimento secundário não-usual (Figura 1A). Nesse tipo de crescimento secundário não-usual, há quatro porções da faixa cambial, opostas entre si duas a duas, que produzem, prioritariamente, floema secundário para o exterior e reduzem extremamente a produção de xilema secundário para o interior. As regiões do câmbio que se alternam com essas faixas apresentam atividade usual, com produção de xilema secundário para o interior e floema secundário para o exterior. O aspecto geral da estrutura é dado pelo lenho interrompido em quatro setores, preenchidos por floema secundário não-usual, em forma de cunha (Figura 1B). Toda a casca, incluindo as cunhas de floema secundário não-usual, tem coloração castanho avermelhado, enquanto que o lenho é mais claro e amarelado (Figura 1B).

A casca (Figura 1B-C) é formada pela periderme, região cortical remanescente, e floema secundário. A periderme é constituída pelo súber pluriestratificado, felogênio de atividade contínua e feloderme (4-5 camadas). Lenticelas são abundantes, mas pouco distintas do restante do súber em caules de maior diâmetro. A região cortical apresenta de oito a dez camadas de células parenquimatosas, alongadas tangencialmente, provavelmente pela pressão de crescimento em diâmetro do caule. Na região cortical, as calotas de fibras do floema primário podem ser observadas. No floema secundário usual (Figura 1C), os elementos de tubo crivado são escassos e inconspícuos, e as placas crivadas são compostas. Os elementos condutores ocorrem associados ao parênquima axial, que é abundante e se dispõe em faixas alternadas com grupos de esclereídeos fibriformes. Os raios são homogêneos e multisseriados, mais dilatados na direção oposta ao câmbio vascular. Na região de floema secundário não-usual (Figura 1D), os raios são unisseriados dentro de cada faixa de floema na cunha, e plurisseriado entre as faixas de floema na cunha; e o parênquima axial é escasso, com

predominância de faixas de fibras alternadas com faixas de elementos condutores abundantes e grande diâmetro, e placas crivadas compostas e oblíquas.

De modo geral, as células parenquimatosas vivas, provavelmente envolvidas na síntese de metabólitos secundários, são abundantes em toda a casca, desde o felogênio até as diversas faixas cambiais, incluindo as cunhas de floema secundário não-usual.

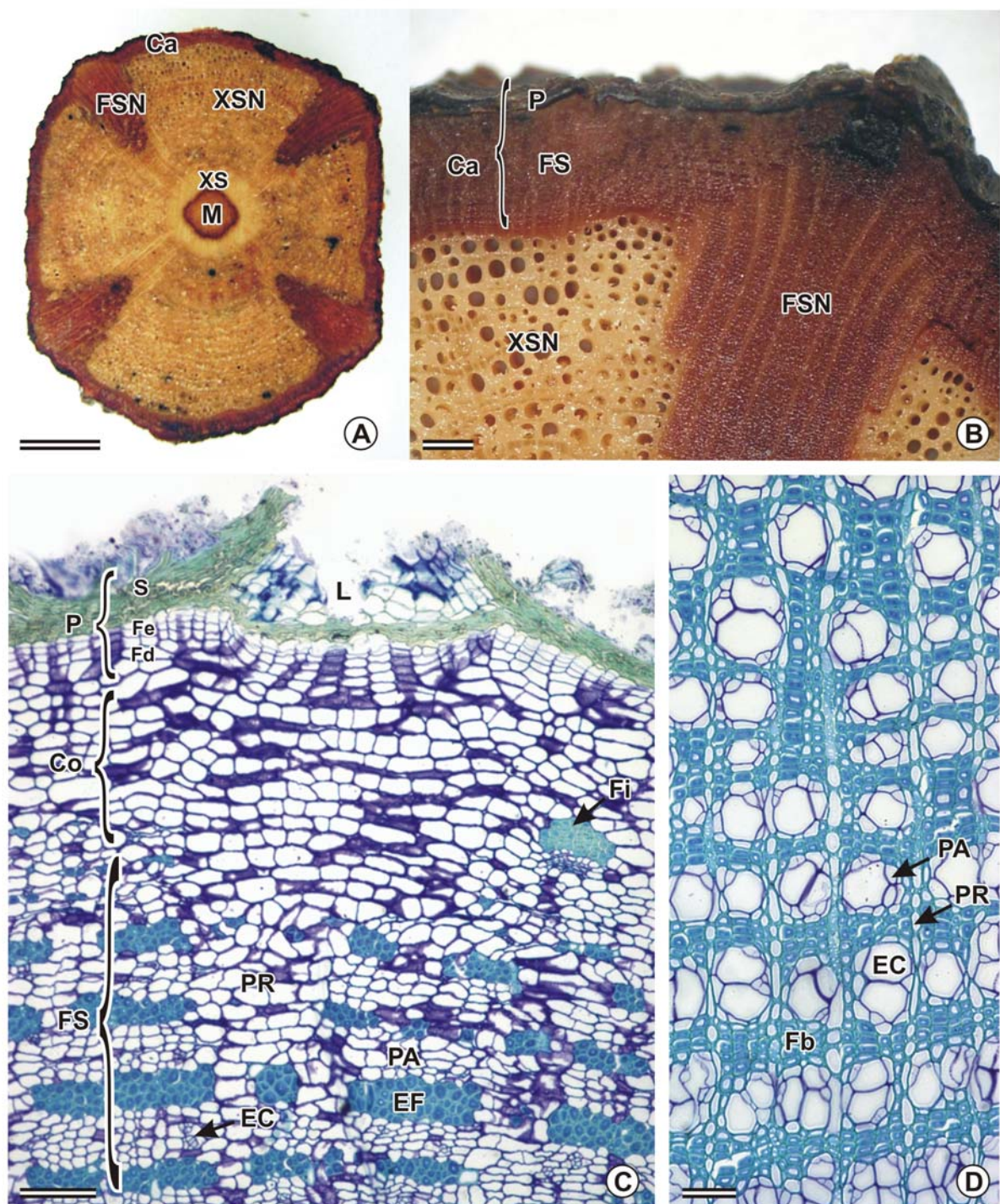


Figura 1. Seções transversais do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae). A, aspecto geral do caule. B, detalhe da figura anterior. C, região da casca, compreendendo periderme e floema secundário usual. D, região do floema não-usual. Ca, casca; Co, córtex; EC, elemento de tubo crivado; EF, esclereídeos fibriformes; Fd, feloderme; Fe, felogênio; Fi, fibra pericíclica; Fb, fibra; FS, floema secundário; FSN, floema secundário não-usual; L, lenticela; M, medula; P, periderme; PA, parênquima axial; PR, parênquima radial; S, súber; XS, xilema secundário usual; XSN, xilema secundário não-usual. Barras: A=5000µm; B=1000µm; C=100µm; D=50µm.

Caracterização histoquímica. O resultado dos testes histoquímicos aplicado à casca do caule de *T. fasciculatus* é apresentado na Tabela 2. A coloração natural da casca é alaranjada (Figura 2A-B), principalmente nas regiões do felogênio, feloderme, córtex e regiões parenquimatosas do floema secundário usual e não-usual. O súber é mais opaco e castanho-alaranjado. No material seccionado, parte do pigmento é liberado na água com o rompimento de algumas células, como também é bastante extraído pelo fixador, deixando o líquido castanho-alaranjado e com odor de cravo-da-índia.

Os alcalóides foram identificados pelos reagentes de Wagner e Dittmar (Figura 2C-D), em toda a região parenquimatosa da casca. Compostos fenólicos também foram identificados na mesma região pelo cloreto férrico (Figura 2E-F) e pelo dicromato de potássio (Figura 2G-H). Taninos não foram identificados pela vanilina clorídrica. Gotículas lipídicas foram identificadas pelo sudan escarlate (Figura 2I-J). O reagente de Nadi, que usualmente reage com óleos essenciais conferindo a coloração azul violeta, neste material evidenciou uma coloração verde escuro (Figura 2K-L), provavelmente uma interação da coloração natural alaranjada com o azul violeta, formando uma cor derivada. Todos os compostos identificados na casca também foram encontrados no floema secundário não-usual, porém, as células parenquimatosas desse tecido são mais escassas.

Polissacarídeos (pectinas, amido e outros) não foram evidenciados pelos testes histoquímicos utilizados.

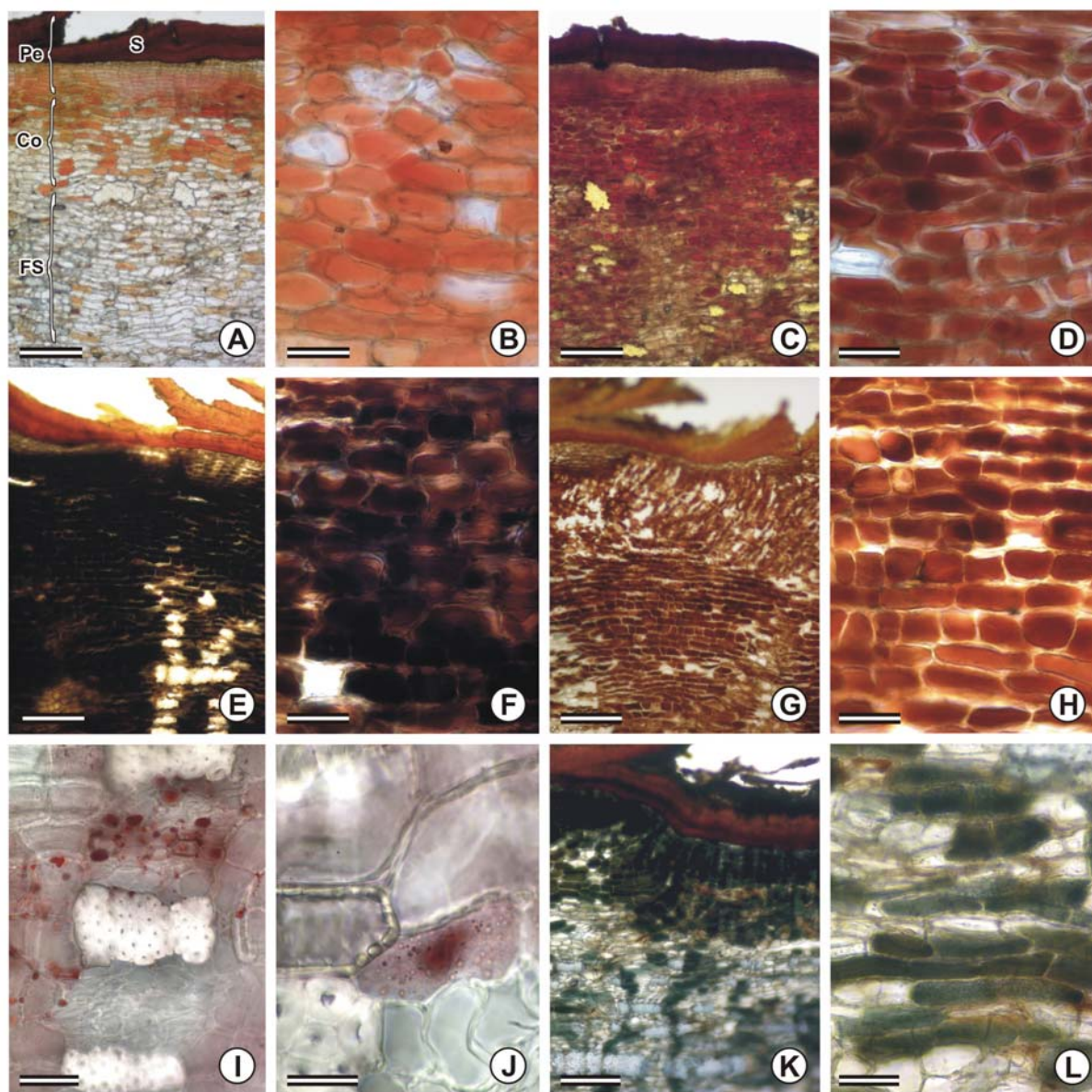


Figura 2. Seções transversais da casca do caule de *Tynanthus fasciculatus* submetidas a diferentes testes histoquímicos. A, branco (*in vivo*). B, detalhe da figura anterior. C, alcalóides corados de castanho avermelhado pelo reagente de Wagner. D, detalhe da figura anterior. E, fenólicos corados de negro pelo cloreto férrico. F, detalhe da figura anterior. G, fenólicos corados de castanho com dicromato de potássio. H, detalhe da figura anterior. I, lipídios corados de vermelho com sudan escarlata. J, detalhe da figura anterior. K, terpenos corados de azul esverdeado com reagente de Nadi. L, detalhe da figura anterior. Co, córtex; FS, floema secundário; Pe, periderme; S, súber. Barras: A, C, E, G, K=200µm; B, D, F, H, I, L=50µm; J=20µm.

Tabela 2. Compostos identificados pelos testes histoquímicos na casca do caule de *Tynanthus fasciculatus*.

Teste	Compostos	Coloração observada	Resultado
LIPÍDIOS			
Sudan red B	lipídios	vermelho	+
Sudan black B	lipídios	azul escuro	+
Azul do Nilo	lipídios ácidos	azul	—
	lipídios neutros	rosa	+
Reagente de Nadi	óleos essenciais	azul-violeta	+
	óleorresinas	rosa	—
CARBOIDRATOS			
PAS	polissacarídeos	magenta	—
Vermelho de rutênio	pectinas	rosa avermelhado	—
Lugol	amido	negro	—
COMPOSTOS FENÓLICOS			
Cloreto férrico	compostos fenólicos	negro	++
Dicromato de potássio	compostos fenólicos	marrom avermelhado	++
Vanilina clorídrica	taninos condensados (proantocianidinas)	vermelho	—
ALCALÓIDES			
Reagente de Wagner	alcalóides	castanho avermelhado	+
Reagente de Dittmar	alcalóides	castanho avermelhado	+
PROTEÍNAS			
Xylidine Ponceau (XP)	proteínas	vermelho	-

Nota: (-): ausente; (+): presente; o número de sinais indica a intensidade da reação

Prospecção fitoquímica. O extrato metanólico das cascas do caule apresentou cor castanha, inodoro e foi utilizado para prospectar aqueles grupos de metabólitos secundários de maior polaridade. Já o extrato hexânico, de coloração amarronzada e odor característico de cravo-da-índia, foi utilizado para investigar a presença de compostos de menor polaridade, como os óleos essenciais, triterpenos e esteróides.

O rendimento do extrato metanólico da casca (EMC) foi de 25,8%, enquanto o extrato hexânico da casca (EHC) foi de 0,8%. O resultado da prospecção fitoquímica realizada nos extrato metanólico e hexânico da casca do caule de *Tynanthus fasciculatus* encontra-se na Tabela 3.

Na prospecção fitoquímica das cascas do caule de *T. fasciculatus*, não foram evidenciadas a presença de cumarinas, antraquinonas e de heterosídeos cardiotônicos.

Flavonóides foram caracterizados por manchas amarelas na região do visível, sendo esta intensificada após aspersão com revelador, as quais também apresentaram forte fluorescência sob luz UV₃₆₅ (Figura 3A). No teste para taninos (Figura 3B), o cromatograma apresentou manchas azuis com grande cauda, característico para esse grupo de metabólitos, que devido ao elevado número de hidroxilas fenólicas em suas estruturas formam várias ligações de hidrogênio com o grupo silanol da fase estacionária, dificultando a separação cromatográfica. A coloração azul das manchas, após aspersão com o reagente cloreto férrico, sugere a presença de taninos hidrolisáveis, uma vez que os taninos condensados se revelam com forte coloração esverdeada nessa condição.

O teste para saponinas (Figura 3C) foi positivo, com zonas amareladas imediatamente após a aspersão com o revelador. A visualização das manchas referentes aos alcalóides (Figura 3D) foi evidenciada pelo aparecimento de duas manchas castanho-avermelhadas, imediatamente após a aspersão do reagente de Dragendorff.

Ao extrato hexânico, as revelações empregando o reagente de vanilina e de Lieberman Burchard indicaram óleo essencial (Figura 3E) e triterpeno/ esteróide (Figura 3F), respectivamente.

Tabela 3. Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos metanólico e hexânico das cascas do caule de *T. fasciculatus*

Grupos de metabólitos secundários	Extrato metanólico	Extrato hexânico
Cumarina	-	NSA
Flavonóide	+	NSA
Tanino	+	NSA
Antraquinona	-	NSA
Saponina	+	NSA
Heterosídeos cardiotônico	-	NSA
Alcalóide	+	NSA
Óleo essencial	NSA	+
Triterpenos/esteróides	NSA	+

Nota: NSA: não se aplica; (-): *ausente*; (+): *presente*

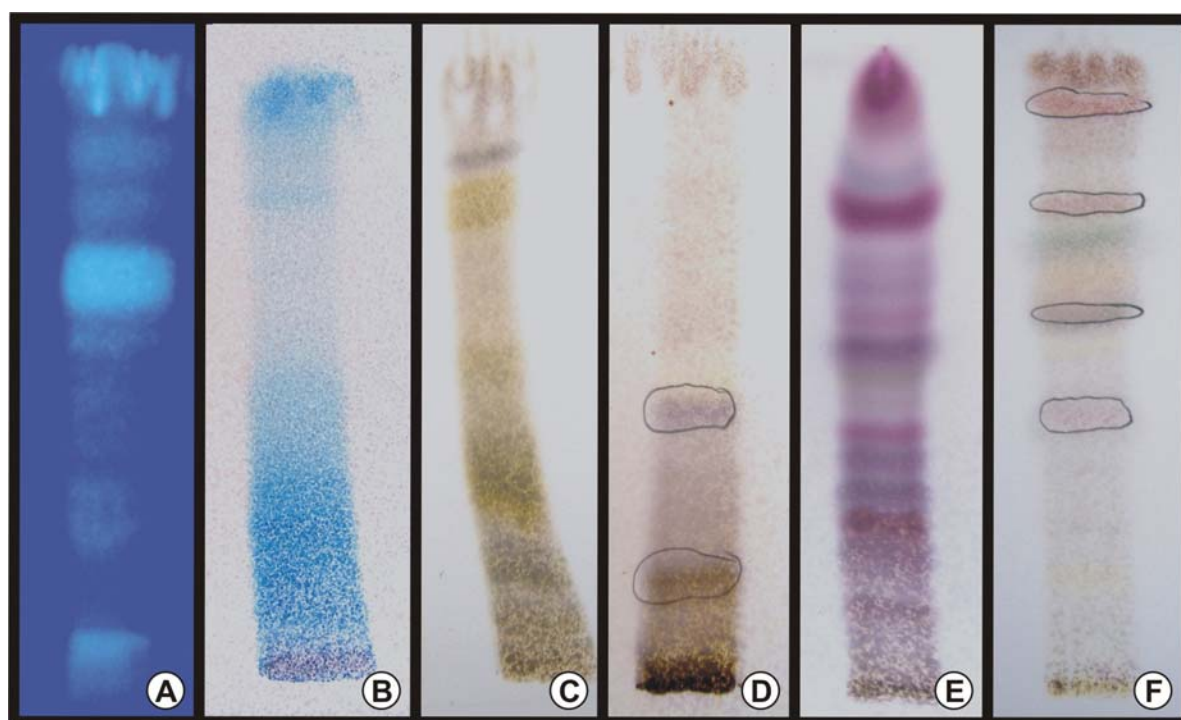


Figura 3. Fotografias dos cromatogramas obtidos por CCD para os extratos metanólico e hexânico das cascas do caule de *T. fasciculatus*. A, flavonóide a 365nm. B, saponina. C, tanino. D, alcalóide. E, triterpeno e esteróide. F, óleo essencial.

Discussão

Muitas espécies de lianas, principalmente Bignoniaceae, possuem importância na medicina popular e podem ser reconhecidas no campo por características morfológicas externas, como textura e coloração da casca e presença e tipo de lenticelas, como também por características organolépticas, como sabor e odor (Gentry, 1980).

O padrão de crescimento secundário não-usual que ocorre em *T. fasciculatus*, com o lenho em forma de cruz-de-Malta, é comum no gênero *Tynanthus* (Boureau & Troisième, 1957; Metcalfe & Chalk, 1950) e em outros gêneros de Bignoniaceae (Mauseth, 1988; Dickison, 2000). O aspecto do lenho, e conseqüentemente do caule, em seção transversal, é muito característico, e pode auxiliar na identificação do material botânico. Porém, o lenho não tem participação efetiva na biossíntese e acúmulo de compostos do metabolismo secundário, mas sim a casca. Conceitualmente, a casca é formada pela periderme, que é o tecido de revestimento propriamente dito, e pelo floema secundário subjacente, além de tecidos corticais que eventualmente sejam mantidos entre a periderme e o floema secundário (Evert, 2006; Mauseth, 1988). A região do floema secundário também é conhecida como “casca interna”, provavelmente pela posição mais interna que ocupa na estrutura da casca. De modo análogo, a periderme também é conhecida como “casca externa”. Os termos “casca externa” e “casca interna” são mais populares que tecnicamente bem aceitos. No caso de *T. fasciculatus*, em que há formação de cunhas de floema secundário não-usual inseridas na massa xilemática (lenho), a região da casca a ser considerada pode se estender até as cunhas de floema secundário. Tanto é, que a coloração avermelhada e o odor de cravo-da-Índia são comuns a toda essa região, assim como as respostas aos testes histoquímicos aplicados.

A periderme de *T. fasciculatus* é originada a partir do felogênio com atividade contínua, instalado na região externa do córtex, conservando na estrutura da casca a feloderme e células parenquimáticas corticais que também participam da síntese e acúmulo de

compostos secundários. Apenas o súber, produzido centrifugamente pelo felogênio, não é representativo como região de biossíntese e acúmulo de compostos secundários. As células do súber são mortas na maturidade, precocemente suberificadas e lignificadas (Fahn, 1989; Evert, 2006).

O floema secundário ocupa a maior proporção da casca, e além de ser constituído por elementos condutores e de sustentação (fibras e esclereídeos), é rico em células parenquimáticas, dispostas tanto no eixo axial (parênquima axial) como no eixo radial (raios). De modo geral, a biossíntese de metabólitos secundários está associada à presença de estruturas secretoras diversas, ou mesmo a células parenquimatosas metabolicamente ativas (Fahn, 1989; Evert, 2006), embora o acúmulo possa ocorrer até mesmo em fibras e elementos condutores de xilema desativados (Fahn, 1989). No caule de *T. fasciculatus* não há estruturas secretoras internas, mas há grande quantidade de células parenquimatosas na casca, principalmente no floema secundário usual. A região do floema secundário não-usual tem menor proporção de células parenquimatosas que o floema secundário usual, portanto contribui menos com a produção de compostos secundários.

O acúmulo efetivo de compostos fenólicos, alcalóides e terpenos, identificados histoquimicamente no caule de *T. fasciculatus*, ocorre na região interna da casca, ou seja, desde o felogênio, seguindo pela feloderme, tecidos corticais, floema secundário usual e não-usual, regiões onde prevalecem células vivas parenquimatosas.

A família Bignoniaceae é rica em metabólitos secundários, como glicosídeos iridóides, alcalóides, naftoquinonas e antraquinonas, complexos ésteres e glicosídeos de *orto*-difenólico, taninos, flavonóides, carotenóides e triterpenos (Gentry, 1980). Dentre a grande diversidade química da família, as naftoquinonas constituem o grupo mais freqüente, do qual se destaca o metabólito lapachol, com atividade bacteriostática, fungistática, antiviral, cercaricida, tripanosomicida, antipirética (Oliveira *et al.*, 1990), antiinflamatório, antiulcerogênico e antitumoral (Fonseca *et al.*, 2003). Entre os triterpenos destaca-se o ácido ursólico com

atividades antiinflamatória, hepatoprotetora, antitumoral e antimicrobiana ativo contra *Trypanossoma cruzi* (Leite, 1998).

Os metabólitos secundários identificados nas cascas do caule de *T. fasciculatus* podem ser agrupados em compostos hidrofílicos, como os glicosídeos, alcalóides e compostos fenólicos, e compostos lipofílicos, como os derivados terpênicos. As análises histoquímica e fitoquímica foram coincidentes na detecção de grupos de compostos secundários na planta, porém alguns grupos elucidados pela prospecção fitoquímica não foram identificados histoquimicamente. Esse fato pode ser justificado pela diferença de sensibilidade entre os dois métodos ou pela inexistência de testes equivalentes na histoquímica.

Entre os grupos de metabólitos secundários detectados no extrato metanólico nas cascas do caule de *T. fasciculatus* estão compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, saponinas e alcalóides.

Os flavonóides possuem larga ocorrência em plantas lenhosas, sobretudo nas cascas, apresentando importância na proteção das plantas pela sua atividade antifúngica. Os flavonóides podem ocorrer nas formas livre ou conjugada formando glicosídeos, sendo esses últimos mais comumente encontrados na casca. A alta polaridade da fase móvel utilizada no teste por CCD é forte indicativo da presença desses compostos na forma de glicosídeos.

Os taninos têm sido os compostos fenólicos mais estudados em ecologia química (Harbone, 1989) e, freqüentemente, as plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento da diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias etc (Santos & Mello, 1999).

As saponinas, de modo geral, ocorrem como misturas complexas; são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, com ação espermicida e anti-helmíntica comprovadas (Schenkel *et al.*, 1999).

Alcalóides, freqüentemente presentes em Bignoniaceae (Hegnauer, 1966, Leite, 1998), constituem um grupo muito heterogêneo sob o ponto de vista químico, bioquímico e

fisiológico, com distribuição restrita a determinadas taxa e ocorrência em diferentes órgãos da planta (Tyler *et al.*, 1988). O modo de ação é bastante variado, podendo interagir com receptores do sistema nervoso ou interferir na atividade de várias enzimas (Taiz & Zeiger, 2004).

Os óleos essenciais e grupos de triterpenos e esteróides foram detectados no extrato hexânico nas cascas do caule de *T. fasciculatus*. Aos óleos essenciais, caracterizados pela mistura complexa de compostos terpênicos e/ou fenilpropanóides, podem ser atribuídas diversas atividades, como antifúngico, por exemplo (Hubbell *et al.*, 1984). A presença de óleo essencial no gênero *Tynanthus* pode ser verificada em ensaio organoléptico, pelo odor característico de cravo-da-índia, constituindo também um critério de identificação (Gentry, 1980) e de avaliação da qualidade do óleo (Simões & Spitzer, 1999). No presente trabalho, as diversas manchas reveladas pelo cromatograma obtido por CCD sugerem uma mistura complexa de terpenóides. Plaza e colaboradores (2005), após avaliação química do extrato hidroalcólico da casca de *T. panurensis*, confirmaram a presença de glicosídeos fenilpropanóides, sendo esses caracterizados como derivados do eugenol, verbascosídeo, isoverbascosídeo e leucosceptosídeo.

Entre os grupos de metabólitos não evidenciados nos extratos analisados estão as cumarinas, antraquinonas e heterosídeos cardiotônicos. Quanto às cumarinas, não existem relato na literatura sobre a sua presença no gênero *Tynanthus*, apesar desse grupo de compostos secundários ocorrer com frequência em Bignoniaceae (Leite, 1998). Entre os compostos quinônicos, as naftoquinonas são mais frequentes em Bignoniaceae, porém ausente em *Tynanthus schumanianum* de acordo com Oliveira *et al.* (1990). Às quinonas, em geral, são atribuídas propriedades alelopáticas (Falkenberg, 1999) e alguns desses metabólitos estão relacionados como pigmentos de madeira (Imamura, 1989). A ausência de heterosídeos cardiotônicos é esperada, pois não existem relatos da presença dessa classe de metabólitos secundários em Bignoniaceae (Rates, 1999).

Contudo, com exceção dos taninos revelados pela técnica cromatográfica, houve concordância dos dois métodos analíticos utilizados na investigação de metabólitos secundários. A maior sensibilidade da técnica cromatográfica pode explicar esse fato. As saponinas, também identificadas pela análise fitoquímica, não foram detectadas histoquimicamente, pois não há testes histoquímicos específicos e eficazes para esse grupo.

Conclusões

A histolocalização dos compostos do metabolismo secundário no caule de *T. fasciculatus* fornece subsídios para a utilização das cascas como droga vegetal e acrescentam dados à monografia já existente na Farmacopéia Brasileira.

O desenvolvimento de técnicas de identificação por CCD para as cascas do caule de *T. fasciculatus*, com o estabelecimento das condições cromatográficas, representa um avanço para a obtenção de ensaios direcionados ao controle de qualidade dessa droga vegetal, já que na Farmacopéia Brasileira, a referida monografia apenas menciona o controle farmacobotânico.

Referências Bibliográficas

- Amorim A, Armada JL, Borba HR, Salles JF. 1994.** Testes de mutagenicidade em camundongos tratados com extratos aquosos de *Tynnanthus fasciculatus* Miers (cipó-cravo). *Revista Brasileira Farmácia* 75(2): 46-47.
- Botsaris AS, Machado PV. 1995.** *Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras*. São Paulo: Ícone Editora.

- Bourdy G, DeWalt SJ, Chávez de Michel LR, Roca A, Deharo E, Muñoz V, Balderrama L, Quenevo C, Gimenez A. 2000.** Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* **70**: 87-109.
- Boureau E, Troisième T. 1957.** *Anatomie végétale L'appareil végétatif des Phanérogames*. Paris: Press Universitaires de France. 633-651.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechninc & Histochemistry* **66**: 111-116.
- Cain AJ. 1947.** The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quartely Journal of Microscopical Science* **88**(3): 383-392.
- Carlquist S. 1982.** The use of ethylenediamine in softening hard plant structures for paraffin sectioning. *Stain Technology* **57**(5): 311-317.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris* **258**: 1338-1340.
- Dickison WC. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Academic Press.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy*. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Fahn A. 1989.** *Plant Anatomy*. 3.ed. Oxford: Pergamon Press.
- Falkenberg MB. 1999.** Quinonas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed da UFSC, 545-570.
- Farmacopéia Brasileira. 1959.** 2.ed. São Paulo: Siqueira.
- Fonseca SGC, Braga RMC, Santana DP. 2003.** Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia* **84**(1): 9-16.
- Furr M, Mahlberg PG. 1981.** Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **44**(2): 153-159.

- Gabe M. 1968.** *Techniques histologiques*. Paris: Masson & Cie.
- Gentry AH. 1980.** *Bignoniaceae – Part I (Crescentieae and Tourrettieae)*, *Flora Neotropica, monogr.* 25. New York : The New York Botanical Garden.
- Gentry AH. 1992.** *Bignoniaceae – Part II (Tribo Tecomeae)*, *Flora Neotropica, monogr.* 25. New York : The New York Botanical Garden.
- Harborne JB. 1989.** Flavonoids. In: Rowe JW., v.I. *Natural Products of woody plants*. Berlin: Springer-Verlag, 533-570.
- Hegnauer R. 1966.** Comparative phytochemistry of alkaloids. In: Swain T. *Comparative phytochemistry*. England: Academic Press.
- Hubbell SP, Howard JJ, Wiemer DF. 1984.** Chemical leaf repellency to an attine ant: seasonal distribution among potencial host plant species. *Ecology* **65**(4): 1067-1076.
- Imamura H. 1989.** Contribution of extractives to wood characteristics. In: Rowe JW. *Natural products of woody plants* v.1, 2.. Berlin: Springer-Verlag, 851-859.
- Jensen W A. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Book Co.
- Leite JPV. 1998.** *Avaliação fitoquímica e da atividade tripanossomicida de Arrabidaea triplinervia H Baill. E Arrabidaea pulchra (Cham.) Sandw. E estudo fitoquímico das folhas de A. triplinervia monitorado por ensaios in vitro contra o Trypanosossoma cruzi*
Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**: 2423-2426.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*. 4.ed. Menlo Park/California: Benjamin Cummings Publishing Company.

- Mendes FR, Carlini EA. 2007.** Brazilian plants as possible adaptogen: an ethnopharmacology survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 493-500.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press. v.2.
- Ming LC, Gaudêncio P, Santos VP dos. 1997.** *Plantas medicinais: uso popular na reserva extrativista "Chico Mendes", Acre*. Botucatu: CEPLAM, UNESP.
- Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. 2000.** The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene Indians. *Journal of Ethnopharmacology* **69**: 139-155.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Oliveira AB, Raslan DS, Miraglia MCM, Mesquita AAL. 1990.** Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova* **13**(4): 302-307.
- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry theoretical and applied, vol. II, 4th. ed.* London: Longman Press.
- Plaza A, Montoro P, Benavides A, Pizza C, Piacent S. 2005.** Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus panurensis*: characterization and LC-MS quantitative analysis. *Journal of Agricultural and food chemistry* **53**: 2853-2858.
- Rates SMK. 1999.** Heterosídeos cardioativos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed. UFSC, 571-596.
- Santos SC, Mello JCP, 1999.** Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed da UFSC, 517-544.

- Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML. 1999.** Saponinas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed da UFSC, 597-640.
- Simões CMO, Spitzer V. 1999.** Óleos Voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed da UFSC, 387-415.
- Taiz L, Zeiger E. 2004.** *Fisiologia Vegetal*, 3.ed. Porto Alegre: Artmed. Editora.
- Tyler VE, Brady ER, Robbers JE. 1988.** *Pharmacognosy*, 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Vidal BC. 1977.** Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22: 45-64.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984.** *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer-Verlag.

CONCLUSÕES GERAIS

A Anatomia Vegetal e a Fitoquímica são ferramentas complementares e necessárias para a caracterização de espécies medicinais, pois fornecem subsídios para a identificação correta da droga e confirmam a presença de compostos de interesse farmacológico.

Em *T. fasciculatus*, a casca apresenta maior quantidade de células parenquimatosas que o restante do caule, o que pode influenciar na biossíntese de metabólitos secundários e, consequentemente, no uso terapêutico da droga vegetal oriunda dessa espécie.