

# Estruturas secretoras da lâmina foliar de amapá amargo (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histoquímica e doseamento de flavonoides

Ana Carla Feio dos SANTOS<sup>1</sup>, Ana Cristina Andrade de AGUIAR-DIAS<sup>2</sup>, Cristine Bastos do AMARANTE<sup>3</sup>, Márlia COELHO-FERREIRA<sup>4</sup>

## RESUMO

Amapá amargo (*Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist) produz um látex, que se presume ter propriedades medicinais, pois é usado no tratamento da malária, problemas pulmonares, gastrite, e como um agente de cura. Este estudo teve como objetivo analisar estrutural e histoquimicamente os locais de produção e/ou acúmulo de compostos biologicamente ativos, bem como realizar o doseamento de flavonóides presentes no limbo do amapá amargo. Para a análise estrutural e histoquímica foram utilizados protocolos padrão em anatomia vegetal. Considerando que, para o doseamento de flavonóides utilizou-se a espectrometria de absorção na região ultravioleta-visível. O sistema secretor das folhas de amapá amargo é constituído de idioblastos secretores e laticíferos ramificados. Os testes histoquímicos revelaram diferentes tipos de substâncias químicas nos protoplastos celulares de idioblastos e laticíferos. Propriedades farmacológicas do látex de amapa amargo podem ser atribuídas à dois compostos químicos (flavonoides e alcaloides) encontrados neste estudo, ambos estão presentes em idioblastos e laticíferos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amapá amargo, Leite de amapá, Alcaloides, Flavonoides.

## Secretory structures from the leaf blade of bitter amapá (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histochemistry and assay of flavonoids.

## ABSTRACT

Bitter amapa (*Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist) produces a latex, which is presumed to have medicinal properties, as it is used in the treatment of malaria, lung problems, gastritis, and as healing agent. This study aimed to analyze structural and histochemically the sites of production and/or accumulation of biologically active compounds, as well as to determine the kind of flavonoids present in the leaf blade of bitter amapa. For structural and histochemical analysis we used standard protocols in plant anatomy. Whereas to assay flavonoids we used absorption spectrometry in the ultraviolet-visible region. The secretory system of bitter amapa leaves is constituted of both secretory idioblasts and branched laticifers. Histochemical tests revealed different types of chemical substances in the cell protoplast of idioblasts and laticifers. Pharmacological properties of bitter amapa latex can be attributed to two chemical compounds (flavonoids and alkaloids) found in this study, both of them are present in idioblasts and laticifers.

**KEYWORDS:** Bitter amapa, Amapa milk, alkaloids, flavonoids.

<sup>1</sup> Coordenação de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa 36570-000 Viçosa, MG. carlinhafeio@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Perimetral, 2501, 66077-530, Montese, Belém, PA, Brasil. acaaguiar@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Magalhães Barata, 376, 66040-170, São Braz, Belém, PA, Brasil, Caixa Postal 399. cbamarante@museu-goeldi.br

<sup>4</sup> Coordenação de Botânica, Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Magalhães Barata, 376, 66040-170, São Braz, Belém, PA, Brasil, Caixa Postal 399. mcoelho@museu-goeldi.br

## INTRODUÇÃO

Entre as famílias botânicas de importância etnofarmacológica, Apocynaceae Juss. inclui espécies popularmente utilizadas como plantas medicinais, com compostos farmacologicamente ativos (Di Stasi e Hiruma-Lima 2002). Tais compostos estão presentes principalmente no látex contido em estruturas conhecidas como laticíferos, que ocorrem tanto nos órgãos vegetativos como nos reprodutivos de plantas desta família (Solleder 1908; Metcalfe e Chalk 1983).

Apocynaceae possui cerca de 400 gêneros e 3700 espécies (Judd *et al.* 2009), no Brasil ocorrem 72 gêneros e 761 espécies, destas 55 possuem a Amazônia como domínio fitogeográfico (Koch *et al.* 2012). Dentre estes, destaca-se o amapá amargo (*Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist), espécie nativa utilizada na medicina tradicional no tratamento de malária, problemas pulmonares, gastrite, fraqueza, cicatrização e como tônico, especialmente por mulheres após o parto (Shanley e Medina 2005).

Os laticíferos possuem fase meristemática curta e por isso é um dos primeiros tipos celulares a diferenciar; enquanto os demais tecidos estão em fase meristemática, os laticíferos estão diferenciados e em fase secretora (Yoder e Mahlberg 1976; Fahn 1979). Para o manejo de plantas latentes isto é importante, pois na maioria das fases do desenvolvimento do vegetal é possível extrair os metabólitos secundários contidos no látex.

Este estudo objetivou analisar estrutural e histoquimicamente os sítios de produção e/ou acúmulo dos compostos biologicamente ativos, bem como realizar o doseamento de flavonoides presentes na lâmina foliar de amapá amargo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material botânico

O material foi coletado no município de Moju, estado do Pará (S 02°10.789' W 048°47.894') em junho de 2011. Durante a coleta notou-se que o látex é liberado de forma abundante, coagulando em cinco minutos. O material fértil foi incorporado ao Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi – MG 202701.

Análise estrutural e histoquímica

Folhas adultas (n=10) foram fixadas em FAA<sub>70</sub> (Johansen 1940), FNT (Lillie 1965) e SFF (Johansen 1940). O material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em parafina histológica. Secções transversais e longitudinais (8-12 µm) foram realizadas em micrótomo de avanço automático (Leica RM 2245, Nussloch, Alemanha) coradas com tripla de

Flemming (Johansen 1940) e montadas em resina sintética (Permout, New Jersey, USA).

Os testes histoquímicos foram realizados em secções a mão livre da nervura principal mediana. Amostras fixadas em FAA foram destinadas aos testes para compostos hidrofílicos, em FNT para lipofílicos e em SFF para compostos fenólicos totais. As classes de metabólitos secundários foram caracterizadas com os seguintes testes e respectivos controles realizados simultaneamente: Sudan black B (Pearse 1985) para lipídios totais, sulfato azul do Nilo (Cain 1947) para lipídios ácidos e neutros, acetato de cobre/ácido rubeânico (Ganter e Jollés 1969, 1970) para ácidos graxos, reagente de NADI (David e Carde 1964) para óleos essenciais e óleo-resinas, cloreto férrico (Johansen 1940) para compostos fenólicos totais, reagente de Dragendorff (Svedsen e Verpoorte 1983) e reagente de Wagner (Furr e Mahlberg 1981) para alcaloides, azul brilhante de Coomassie (CBB) (Fischer 1968) para proteínas totais, ácido periódico/reagente de Schiff (McManus 1948) para polissacarídeos totais, vermelho de rutênio (Gregory e Baas 1989) e ácido tânico/cloreto férrico (Pizzolato e Lillie 1973) para mucilagens. Realizou-se as micrografias de luz com microscópio *Axiolab Zeiss* com câmera digital *Canon* acoplada.

### Doseamento de flavonoides

As folhas foram secas em estufa à 60° C e trituradas em moinho de facas, 2,0 g de amostra seca e pulverizada foi submetida à extração com 150 mL de metanol 70% à temperatura ambiente por 48 h. O extrato metanólico foi filtrado à vácuo e o volume completado para 250 mL. Na alíquota de 15 mL foi acrescida de 1 mL de cloreto de alumínio 50,0 mg mL<sup>-1</sup> e o volume completado para 50 mL.

As análises quantitativas foram em espectrofotômetro (Spectro Vision, UV-Visível DB 1880S, China). Para a extração foi utilizado metanol grau analítico (Vetec, Duque de Caxias-RJ, Brasil). Para metodologia analítica utilizaram-se água destilada e cloreto de alumínio em metanol a 50,0 mg mL<sup>-1</sup> (Vetec, Duque de Caxias-RJ, Brasil). A rotina 99,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi empregada como padrão para flavonoides.

Para a determinação do teor de flavonoides totais foi construída uma curva de calibração de acordo com Santos e Blatt (1998) e Rio (1996). O desempenho do método foi avaliado através do estudo dos parâmetros analíticos: intervalo de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e seletividade/especificidade. A linearidade foi avaliada utilizando concentrações de rutina de 7,0 a 20,0 µg mL<sup>-1</sup>, os limites de detecção e quantificação foram estimados (em µg mL<sup>-1</sup>) considerando o desvio padrão correspondente a dez leituras do branco. O ensaio de especificidade foi com extrato metanólico das folhas de *P. fasciculata* e rutina como padrão, ambos na concentração de 18,0 µg mL<sup>-1</sup>. Os espectros

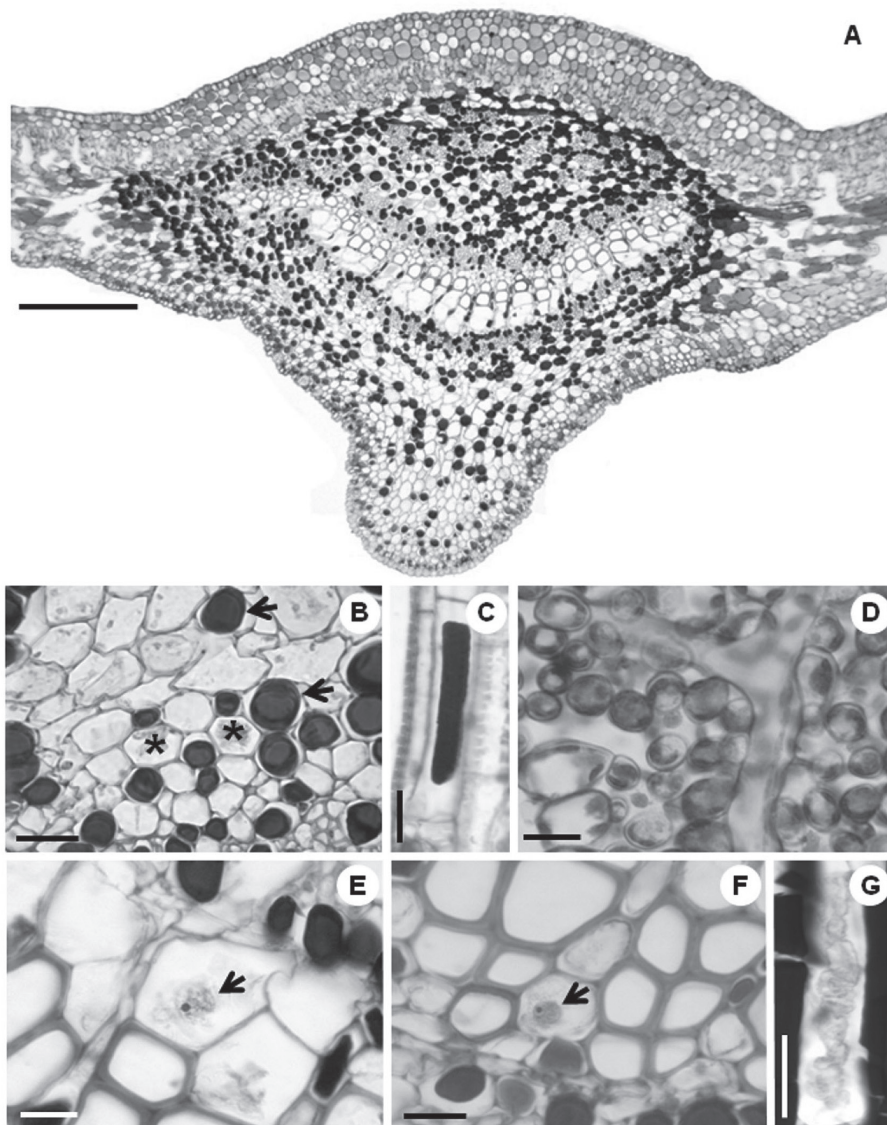
de absorvância foram realizados na faixa entre 375 e 500 nm. O parâmetro recuperação foi realizado em triplicata.

## RESULTADOS

O sistema secretor foliar de amapá amargo está constituído por numerosos idioblastos secretores, bem como por laticíferos (Figura 1A). Os idioblastos secretores estão dispersos principalmente no parênquima fundamental da nervura principal de amapá amargo, possuem conteúdo denso

acidófilo, fortemente corado pela safranina (Figuras 1B, 1C), e caracterizam-se por serem células com paredes delgadas, semelhantes as do parênquima.

Quanto à tipologia, foram observados laticíferos ramificados presentes ao longo da lâmina foliar, sendo evidentes no parênquima paliçádico (Figura 1D) e no parênquima fundamental da nervura principal (Figura 1B, 1D), bem como associados ao feixe vascular (Figuras 1E, 1F).



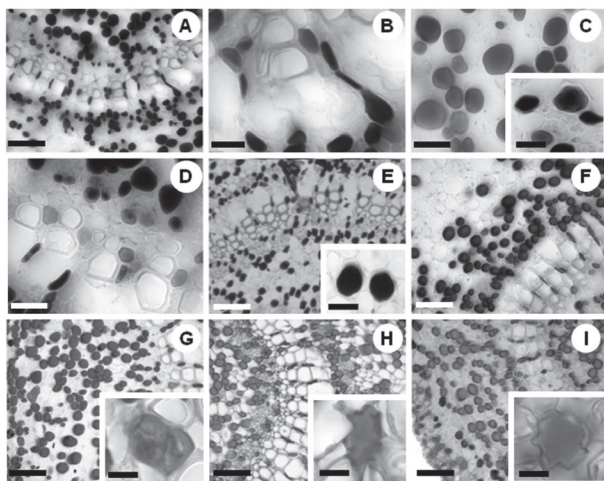
**Figura 1** - Micrografias de luz das secções da lâmina foliar de *Parahancornia fasciculata*. **A**: vista geral da nervura principal mediana; **B**: secção transversal dos laticíferos na região cortical da nervura principal (asterisco) e idioblastos com conteúdo denso acidófilo (setas); **C**: detalhe da secção longitudinal de um idioblasto; **D**: secção longitudinal do laticífero ramificado no parênquima paliçádico; **E, F**: vista transversal do laticífero associado ao feixe vascular; **E**: associado ao floema; **F**: laticífero associado ao xilema; **G**: detalhe do laticífero em secção longitudinal, notar secreção em seu interior. **Barras**: 150  $\mu\text{m}$  (A); 60  $\mu\text{m}$  (B, F); 30  $\mu\text{m}$  (C, D, E), 40  $\mu\text{m}$  (G).

Devido ao grande número de idioblastos, foi possível distinguir estruturalmente os laticíferos a partir de seu protoplasto, com núcleos esféricos ou fusiformes (Figuras 1E, 1F), apresentando apenas um nucléolo evidente e a viscosidade da secreção (Figura 1G), e de suas ramificações, observadas principalmente em secção longitudinal (Figura 1D).

Em campo, não havia qualquer sinal de predação nos indivíduos de amapá amargo e durante as coletas, a rápida coagulação do látex também demonstrou a eficiência desta secreção.

Os testes histoquímicos revelaram diferentes classes de substâncias químicas tanto no protoplasto dos idioblastos como no protoplasto dos laticíferos. Nos idioblastos foram detectados lipídios totais (Figura 2A, 2B), lipídios ácidos (Figura 2C), especificamente ácidos graxos (Figura 2D), compostos fenólicos totais (Figura 2E, *inset*), alcaloides (Figura 2F) e polissacarídeos totais (Figura 2G, *inset*), especificamente mucilagens ácidas (Figura 2H, *inset*). Já os laticíferos, diferem dos idioblastos por apresentarem ainda proteínas (Figura 2I, *inset*) e pela ausência de ácidos graxos.

O teor de flavonoides totais, expressos em rutina, contido nas folhas de amapá amargo foi de  $0,32 \pm 0,002$  mg de flavonoides totais por grama de folha seca. Para a análise de especificidade do método proposto pode-se observar na



**Figura 2** - Testes histoquímicos mostrando reações positivas para diferentes classes de substâncias químicas presentes nos idioblastos e nos laticíferos da lâmina foliar de *Parahancornia fasciculata*. **A e B**: detecção de lipídios totais nos idioblastos e laticíferos; **C**: reação para lipídios ácidos fortemente positiva nos idioblastos e positiva nos laticíferos; detalhe de idioblastos e laticíferos no *inset*; **D**: resultado positivo para ácidos graxos nos idioblastos; **E**: detecção de compostos fenólicos totais nos idioblastos e laticíferos; detalhe dos idioblastos no *inset*; **F**: alcaloides evidenciados em idioblastos e laticíferos pelo Reagente de Dragendorff; **G**: polissacarídeos totais nos laticíferos; detalhe do laticífero no *inset*; **H**: conteúdo mucilaginoso no látex; detalhe do laticífero no *inset*; **I**: conteúdo protéico no látex; detalhe do laticífero no *inset*. **Barras**: 60  $\mu\text{m}$  (A, E, F, G, H, I); 40  $\mu\text{m}$  (B, C, D); 25  $\mu\text{m}$  (*insets*).

Figura 3 o espectro obtido para o extrato de amapá amargo e para a solução de rutina, ambos na concentração de  $12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , na faixa compreendida entre 375 e 500 nm, sendo evidenciado apenas um pico de absorção máxima a 420 nm. Com isso, foi confirmado que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente o padrão para flavonoides e os contidos no extrato, mesmo na presença de impurezas.

O método espectrofotométrico empregado apresentou linearidade a 420 nm para as concentrações estudadas ( $0,0$  a  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração foi  $y = 0,0314x + 0,0155$ , em que  $y$  é a absorbância (nm) e  $x$  a concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em equivalentes de rutina. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram  $0,17$  e  $0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Com esses resultados, verifica-se que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento.

## DISCUSSÃO

Os idioblastos secretores presentes em *P. fasciculata* são um dos tipos celulares comuns tanto nos órgãos vegetativos como nos reprodutivos de Apocynaceae (Santos *et al.* 2009).

Solereider (1908) e Metcalfe e Chalk (1983) descreveram laticíferos não-articulados e ramificados para a maioria das Apocynaceae. Contudo, laticíferos articulados e ramificados também vêm sendo descritos para esta família, como nos trabalhos de Demarco *et al.* (2006) e Demarco e Castro (2008).

A presença de laticíferos é considerada como uma síndrome de defesa que propiciou uma maior diversidade das linhagens que os possuem em relação aos seus grupos irmãos (Farrell *et al.* 1991). Mesmo com os dois tipos de laticíferos sendo relatados para algumas espécies desta família (Mahlberg 1993), o presente estudo corroborou tais estudos quanto a ramificação, necessitando de futuras investigações ontogenéticas do primórdio foliar para obter conclusões quanto a articulação dos mesmos, já que a presente análise foi realizada em órgãos adultos.

Entre outras funções, o látex e seus metabólitos secundários associados são essenciais na proteção da planta contra herbívoros, microorganismos e para selar ferimentos (Farrell *et al.* 1991; Demarco *et al.* 2006). O papel defensivo desta secreção deve-se ao seu rápido depósito nos espaços intercelulares e no interior das células, formando uma barreira repelente e impenetrável que envolve completamente um possível patógeno (Farrell *et al.* 1991).

Neste estudo, as funções atribuídas ao látex estão relacionadas às propriedades de dois dos metabólitos secundários inventariados a partir das análises histoquímicas

e da espectrometria de absorção na região do ultravioleta-visível: compostos fenólicos, em especial os flavonoides, e os alcaloides. A presença de amido e proteínas nos laticíferos é um dado relatado com menor frequência para Apocynaceae; contudo, pode ser explicada pelo fato do látex ser o próprio protoplasto da célula laticífera (Demarco *et al.* 2006), no qual estes compostos podem ser naturalmente encontrados. Além destes, mucilagens também foram evidenciadas principalmente nos laticíferos.

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos nos vegetais (Simões *et al.* 2000) e envolvem uma gama de substâncias, dentre as quais se destacam cumarinas, ligninas, quinonas, taninos e flavonoides (Castro e Demarco 2008). Nos vegetais onde são sintetizados, estes compostos desempenham diversas funções, como proteção contra herbivoria, atração de polinizadores e atividade alelopática (Castro e Demarco 2008).

O teor de flavonoides totais presentes nas folhas ( $0,32 \pm 0,002$  mg de flavonoides totais por grama de folha seca) é considerado baixo quando comparado aos teores encontrados em folhas de outras espécies de Apocynaceae (Vaghasiya *et al.* 2011).

Em *Alstonia scholaris* (L.) R. Br., por exemplo, não foram detectados flavonoides, isto porque a proporção de metabólitos secundários produzidos pela planta depende do *habitat*, do regime de chuvas, da insolação, do solo, da sazonalidade, entre outras características climático-edáficas a que está exposta no local de cultivo (Freire *et al.* 2006), inclusive no momento da coleta. Nesse sentido, é considerável o número de variáveis

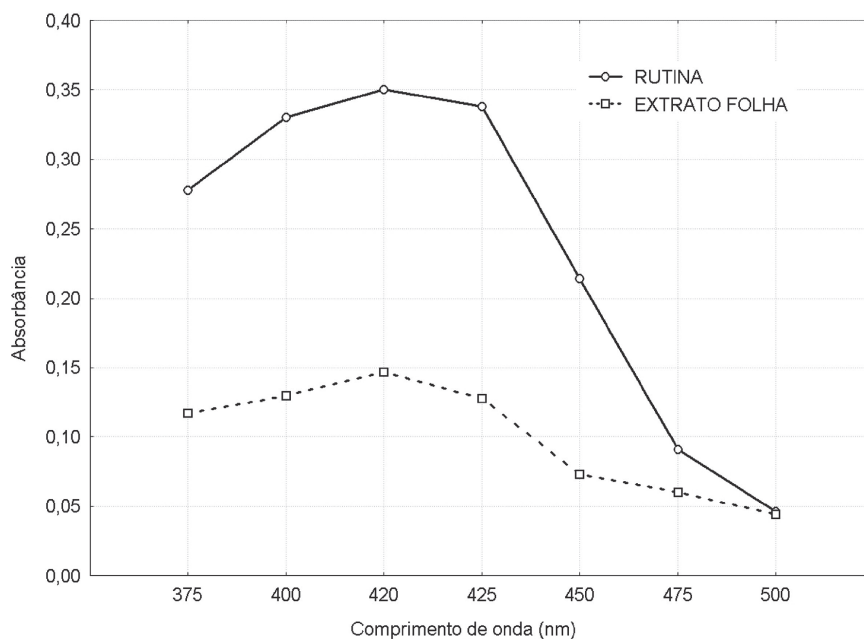
a serem investigadas em estudos posteriores envolvendo a quantificação de flavonoides na espécie estudada, a fim de se confirmar este resultado.

O coeficiente de determinação obtido ( $r^2 = 0,9975$ ) apresentou excelente linearidade no intervalo avaliado, as recuperações nas amostras foram próximas de 100% (84% - 102%), portanto dentro dos critérios de aceitação (80-120%), mostrando boa exatidão da metodologia utilizada (Brasil 2003).

Apesar da síntese dos flavonoides não ocorrer na espécie humana, possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos, e muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana (Ratty e Das 1998). Além de anticoagulantes, são antihipertensivos e protegem os vasos sanguíneos (Bruneton 1995), possuem também capacidade antioxidativa (Dornas *et al.* 2007), atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador (Silva *et al.* 2002), antialérgica, antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (Ratty e Das 1998).

Diversos vegetais aplicados na medicina popular possuem ações atribuídas aos flavonoides, mas diante de tantas propriedades biológicas, há necessidade de aprofundar as investigações dos mecanismos destes compostos, em especial daqueles de amapá amargo, verificando à que propriedades farmacológicas estes compostos estão associados.

Cerca de 400 alcaloides já foram descritos para Apocynaceae no final da década de 80 (Moura e Agra 1989). Os alcaloides



**Figura 3** - Especificidade do método construído com padrão rutina ( $12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e com os extratos etanólicos obtidos das folhas e das cascas de *P. fasciculata* ( $12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

são compostos nitrogenados que podem estar presentes em diversas partes da planta, no entanto, tecidos em crescimento ativo, epiderme, hipoderme, bainhas vasculares e laticíferos são os tecidos e estrutura que se destacam como preferenciais (Simões *et al.* 2000). Em amapá amargo, os alcaloides foram observados tanto em laticíferos como em idioblastos. Esta presença em ambas as estruturas pode ser pelo fato de parte da síntese de precursores como os alcaloides indólicos, ou parte do armazenamento de compostos bioativos como os alcaloides tropânicos e nicotínicos, ocorrer no vacúolo dos idioblastos secretores (DeLuca e Cutler 1987; DeLuca e St-Pierre 2000).

Muitos alcaloides são descritos como tóxicos, agindo contra herbívoros e parasitas, além de apresentarem efeito alelopático (Robinson 1974). Simões *et al.* (2000) afirmaram que, em grandes quantidades, os alcaloides podem ser tóxicos também para humanos, no entanto, em pequenas quantidades podem ser farmacologicamente úteis.

Braga *et al.* (2007) estudando as atividades anti-leishmaniose e antifúngicas de algumas plantas medicinais brasileiras, puderam concluir que a presença de alcaloides e flavonoides em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) possui forte relação com a sua atividade contra *Leishmania amazonensis*, e principalmente com sua atividade antifúngica. Supostamente, amapá amargo que apresenta ambos os metabólitos, possui potencial semelhante, necessitando da continuidade das investigações para que a validade desta hipótese seja verificada.

A mucilagem é um constituinte natural do vegetal, sendo mais comum em vegetais e órgãos com função de retenção de água (Simões *et al.* 2000). Por esta razão, a presença desta substância tanto nos idioblastos como nos laticíferos pode estar relacionada com a toxicidade do látex desta espécie; possivelmente diluindo os demais metabólitos presentes no látex, tornando-o menos tóxico, já que a retenção de água é umas das funções atribuídas às mucilagens (Fahn 1979).

Empiricamente, vendedores e coletores deste produto afirmam que não se deve coletá-lo durante a estação seca, quando ele está concentrado e mais tóxico (Shanley e Medina 2005). Logo, a presença desta secreção de natureza mista pode indicar que o látex do amapá amargo está mais diluído e adequado ao consumo. Esta indicação é validada pela forma em que o látex de amapá amargo é consumido, pois nunca é tomado puro, mas sempre misturado com água, leite, café ou mel (Shanley e Luz 2003).

Os resultados obtidos são novos registros de um dos produtos florestais, com potencial medicinal, de grande importância e utilização no mercado amazônico. Suas estruturas secretoras, em grande parte, são peculiares às Apocynaceae e o exsudado também se mostrou convergente ao padrão já descrito na literatura.

Este estudo é um ponto de partida para demais trabalhos relacionados ao potencial desta espécie, já que as funções designadas ao látex de amapá amargo podem ser atribuídas à presença de compostos fenólicos e de alcaloides, aos quais são conferidas inúmeras atividades nos vegetais e animais, além de mucilagem, que possivelmente está relacionada com a diluição dos compostos tóxicos e consequentemente com a diminuição da toxicidade do látex. Assim, constata-se a necessidade de estudos mais aplicados que investiguem a especificidade destas classes de metabólitos e, consequentemente, a melhor aplicação na farmacologia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa do Programa de Capacitação Institucional (PCI-D) concedida à primeira autora, à Rede de produtos naturais para a quimioterapia antimalárica (555655/2009-1) pelo financiamento da pesquisa e ao Laboratório de Aracnologia do Museu Goeldi pela utilização do microscópio com câmera digital acoplada.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Braga, F.G.; Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L.; Matos, M.O.; Moreira, F.O.; Scio, E.; Coimbra, E.S. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 396-402.
- Brasil. 2003. *Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E. nº 899 de 29 de maio de 2003. ([http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION;i](http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION;i)). Acesso em: 25 jul. 2010.
- Bruneton, J. 1995. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Intercept, Paris Lavoisier/Andover. 915 p.
- Cain, A.J. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 33: 383-392.
- Castro, M.M.; Demarco, D. 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications*, 3: 1273-1284.
- David, R.; Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris*, 258: 1338-1340.
- DeLuca, V.; Cutler, A.J. 1987. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 85: 1099-1102.
- DeLuca, V.; St-Pierre, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5: 1360-1385.
- Demarco, D.; Castro, M.M. 2008. Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas. *Revista Brasileira de Botânica*, 31: 701-713.

- Demarco, D.; Kinoshita, L.S.; Castro, M.M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 133-144.
- Di Stasi, L.; Hiruma-Lima, C. A. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 Ed. rev. e ampl.. UNESP, São Paulo. 605 p.
- Dornas, W. C.; Oliveira, T. T.; Rodrigues-Das-Dores, R. G.; Santos, A. F.; Nagem, T. J. 2007. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28: 241- 249.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London. 302 p.
- Farrell, B.D.; Dussourd, D.E.; Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist*, 138: 881-900.
- Fischer, D.B. 1968. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16: 92-96.
- Freire, C.M.M.; Ortiz, M.; Marques, M.; Costa, M. 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 161-166.
- Furr, M.; Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 44: 153-159.
- Ganter, P.; Jollés, G. 1969, 1970. *Histologie normale et pathologique*. v.1 e 2. Gauthier-Villars, Paris. 1904 p.
- Gregory, M.; Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany*, 38: 125-174.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. 2ª Ed. McGraw Hill, New York. 523 p.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. 2009. *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3ª Ed. Artmed, Porto Alegre. 632 p.
- Koch, I.; Rapini, A.; Simões, A.O.; Kinoshita, L.S. 2012. Apocynaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004877>. Acesso em: 25 de maio de 2012.
- Lillie, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3ª Ed. McGraw-Hill Book Company, New York. 751 p.
- Mahlberg, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review*, 59:1-23.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 23: 99-108.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1983. *Anatomy of the dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction*. v. 2. 2ª Ed. Clarendon Press, Oxford. 308 p.
- Moura, M.D.B.; Agra, M.F. 1989. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 3: 273-279.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry theoretical and applied*. v.2. 4ª Ed. C. Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York. 1055 p.
- Pizzolato, T.D.; Lillie, R.D. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 21: 56-64.
- Ratty, A.K.; Das, P.N. 1998. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39: 69-79.
- Rio, R.G.W. 1996. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 74 p.
- Robinson, T. 1974. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, 184: 430-435.
- Santos, M.D.; Blatt, C.T.T. 1998. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 21: 135-140.
- Santos, M.C.A.; Freitas, S.P.; Aroucha, E.M.M.; Santos, A.L.A. 2009. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 9: 24-30.
- Shanley, P.; Luz, L. 2003. The impact of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in eastern Amazônia. *Bioscience*, 53: 573-584.
- Shanley, P.; Medina, G. 2005. *Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica*. Belém: Cifor/Imazon,. Disponível em: <http://www.cifor.cgiar.org/Publications/Detail?pid=1732>. Acesso em: 01 de janeiro de 2012.
- Silva, R.R.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Leão, M.A. 2002. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina, Ribeirão Preto*, 35: 127-133.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2000. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ª Ed. rev. UFSC, Porto Alegre.
- Solereider, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. v. 1. Clarendon Press, Oxford. 1104 p.
- Svendsen, A.B.; Verpoorte, R. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publish Company, Amsterdam and New York. 503 p.
- Vaghasiya, Y.; Dave, R.; Chanda, S. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants from Western Region India. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5:567-576.
- Yoder, L.R.; Mahlberg, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63: 1167-1173.

Recebido em: 23/04/2012

Aceito em: 16/08/2012

