

Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).

Santos, M.C.A.¹; Freitas, S. de P.²; Aroucha, E.M.M.³; Santos, A.L.A.⁴.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi averiguar a anatomia e detecção de compostos secundários em folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). A amostra das regiões nodais da parte superior da planta, e raiz secundária, passou por diferentes tratamentos com fixação usando corantes específicos. A lâmina foliar em secções transversais foi classificada como anfiestomática, com mesofilo dorsiventral. A raiz apresenta sistema vascular bastante desenvolvido com contorno aproximadamente circular e córtex regular. Verificou-se presença de alcalóides, na raiz e lâmina foliar, compostos fenólicos e pectina na lâmina foliar.

Palavras-chaves: compostos secondary, anfiestomática, alcalóides.

Anatomical and histochemical of leaves and roots of vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the anatomy and detection of composites secondary in leaves and roots of vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). The samples of the node's regions, superior part of the plant, and roots secondary, passed by different treatments as attachment by using coloring specific. The blade to foliate in secções transversals was classed as amphystomatic, with dorsiventral mesophyll. The root with vascular system developed with contour approximately to circulate and regular cortex. Alkaloids presence was verified, in the root and foliar blade, phenolic composites and pectin in the foliar blade.

Keywords: Secondary composites, amphystomatic, alkaloids.

1 INTRODUÇÃO

Vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) (Apocynaceae), é uma planta reconhecida pela importância na medicina, pois é rica em alcalóides que apresentam ação anticancerígena, antiglicêmica e antitérmica. As espécies de Apocynaceae como a vinca a possuem importância econômica e/ou medicinal devido à presença de metabólitos secundários no látex como, por exemplo, borracha e alcalóides (Metcalf & Chalk 1950, Yoder & Mahlberg 1976). Sabe-se, que o látex possui funções de proteção contra herbívoros e microorganismos, e de selar ferimentos (Fahn 1990, Farrel *et al.* 1991). St-Pierre *et al.* (1999), observou em

folhas e raízes de vinca a presença de alcalóides. Já em trabalho realizado em vinca por Mahroug *et al.* 2007, também se detectou compostos metabólicos secundários (alcalóides indol monoterpênico - vinblastina e vincristina), em várias partes da planta, sendo usados na produção de medicamentos farmacêuticos, com efeito, antitumoral. Para obter 1g de vinblastina é necessária em média toneladas de folhas secas de *Catharanthus roseus* (Sottomayor *et al.* 2004).

O conhecimento de aspectos anatômicos de plantas medicinais é importante para o seu manejo adequado, já que permite localizar as suas estruturas secretoras, bem como definir, em alguns casos, o momento em que as glândulas

estão em pleno desenvolvimento (Ming 1994, Akisue & Oliveira 1987). Os laticíferos são um dos primeiros tipos celulares a se diferenciar; sua fase meristemática é muito breve e, enquanto a maioria dos tecidos ainda é meristemática, os laticíferos já estão diferenciados e em fase secretora. (Yoder & Mahlberg 1976). A presença de laticíferos em Apocynaceae tem importância devido à proteção conferida pelo látex, que propicia o sucesso das espécies nos diversos ambientes, para plantas latescentes e resiníferas, como proposto por Farrell *et al.* 1991. A capacidade de muitas plantas para sintetizar metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcalóides e antocianina, está associada com sua disposição anatômica (Azevedo 1998).

Os metabólitos secundários são expressões da individualidade química dos organismos, diferindo qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie. A histoquímica das plantas permite detectar a presença desses metabólitos, que poderão ser quantificados, em função da intensidade observada. Muitos desses compostos, como a antocianina, carotenóides e óleos essenciais podem influenciar na polinização, na dispersão de frutos e sementes e na simbiose radicular com bactérias enfatizam Martins *et al.* (1994); outros compostos apresentam função de suporte estrutural para as plantas, como as ligninas (Mann 1987). O vermelho de rutênio é utilizado em microscopia ótica desde 1890 na coloração de pectinas, mucilagens e goma foi introduzida na microscopia eletrônica de transmissão e no estudo de células animais, para detecção citoquímica de poliosídios e mucopolissacarídeos ácidos (Luft 1971).

Este trabalho tem por objetivo descrever a anatomia e detectar por meio da histoquímica a presença de alcalóides na lâmina foliar e raiz de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), e detectar substâncias pécticas e compostos fenólicos em folhas de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas foram coletadas em jardins residenciais no município de Campos dos Goytacazes-Rj. A identificação da espécie vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don),

confirmada pelo Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campina, com citação do material: BRASIL: Campos RJ:: Turf-Club, 07/03/2003, fl./fr., C. Aroucha s.n. (SP, UEC). E os ensaios anatômicos e histoquímicos conduzidos no Setor de Citologia Vegetal do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biologia e Biociências da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As exsiccatas foram constituídas dos ramos superiores das plantas. Os procedimentos, abaixo descritos, foram realizados em folhas coletadas do 2º e 3º nó e raiz secundária a 3,0cm do ápice, em perfeito estado de desenvolvimento fitossanitário.

Através dos testes anatômicos, os fragmentos de folhas foram lavados em tampão fosfato salina (PBS) e colocados em uma solução 1:1 de ácido nítrico 10% e óxido crômico 10% (Jensen 1962). Em seguida foram dissociadas as faces, adaxial e abaxial, e sobre lâminas corou-se com azul de metileno e seladas com glicerina 50% e observados os tipos de estômatos, o formato das células epidérmicas através do microscópio de luz (Axioplan, ZEISS).

As amostras de fragmentos de lâmina foliar e raiz foram fixadas, em temperatura ambiente, em solução aquosa com paraformaldeído a 4,0%, glutaraldeído a 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05M. Procedeu-se três lavagens na lâmina foliar, com intervalo de 30 minutos cada, em solução tampão de cacodilato 0,05M, pós-fixadas, por uma hora, em solução de tetróxido de ósmio a 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05M. Após três lavagens de 30 minutos no mesmo tampão, realizou-se uma série ascendente de desidratação cetônica (50%, 70%, 90%, e três vezes 100%), por uma hora cada etapa (Johansen 1940). Após infiltração, com resina Epon (Epóxi Poli-bed), a lâmina foliar foi colocada em fôrma e desidratada em estufa a 60°C por 48 horas, para a polimerização e obtenção de blocos. Utilizando ultramicrótomo (Reichert, ultracuts), foram retirados cortes semifinos a 0,70µm de espessura, corados com azul de toluidina 1%. As lâminas após seladas com Entelan foram observadas em microscópio de luz (Axioplan, ZEISS).

Por meio dos testes histoquímicos, foram feitos cortes transversais da folha e raiz *in*

natura, e em placa de petri, com reagentes de colorações específicas, para evidenciar compostos secundários em microscópio de luz (Axiophoto, ZEISS). Para a detecção de alcalóides fez cortes na lâmina foliar, utilizando o reativo de Dragendorff (Costa 1982), durante dois minutos seguiu-se com lavagem dos cortes em água destilada. Novos cortes foram feitos em lâminas foliares, para detecção de substâncias pécnicas, impregnando os cortes em vermelho de rutênio (Langeron 1949), em seguida foi observado em microscópio óptico. Em cortes feitos em laminas foliares e colocados em solução aquosa a 10% de cloreto férrico e carbonato de sódio (Johansen 1940), foram detectados compostos fenólicos.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Em cortes anatômicos, pode-se observar através da dissociação das epidermes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), há presença dos estômatos nas duas faces da lâmina foliar, sendo assim classificada de anfistomática. Ambas as epidermes apresentam as células com paredes anticlinais levemente ondulados em formas e tamanhos variáveis, com presença de estômatos do tipo anomocíticos (Figura 1A) e paracítico (Figura 1B), geralmente solitários, acompanhados por 4-5 células anexas. Na face adaxial, foi observadas células de variados tamanhos e formato arredondado, enquanto que a face abaxial apresenta células de formato irregular, achatadas, de tamanhos variados.

Há presença de tricomas tectores nas duas faces, no entanto, os tricomas glandulares não foram observados com maior nitidez (Figura 2). Os tricomas podem ser glandulares, possuindo células especializadas para a produção e secreção de substâncias químicas, ou tectores Cutter (1986). Os tricomas são apêndices epidérmicos com função, geralmente, ecológica, isto é, de adaptação da planta ao meio, como defesa contra herbívoros e patógenos, atração de insetos úteis, como os polinizadores, repulsão dos nocivos e redução da perda de H₂O pela transpiração e temperatura foliar (Werker & Fahn 1981).

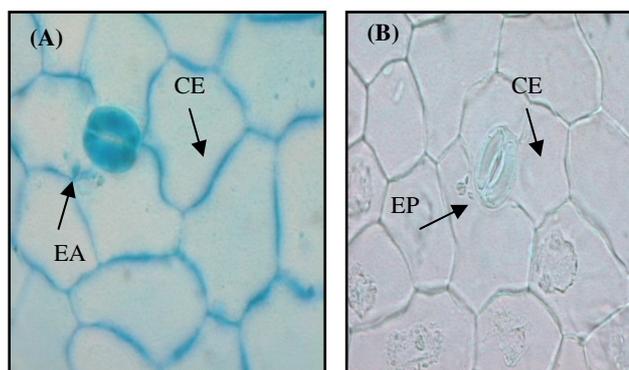


FIGURA 1 - Anatomia foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Face abaxial (A): estômato anomocíticos – EA, célula epidérmica – CE. Face adaxial (B): estômato paracítico – EP, célula epidérmica – CE. 400x.

Observa-se com frequência a presença de tricomas tectores unisseriados, unicelulares ou bicelulares, agudos no ápice e alguns levemente recurvados, possuindo ornamentação na sua superfície (Figura 2). A distribuição desses tricoma mostrou-se variável, pois a face abaxial apresenta tricomas tectores em maior número que o observado na face adaxial.

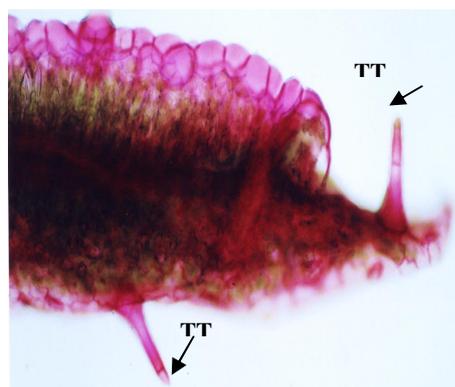


FIGURA 2. Anatomia foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Face adaxial foliar: tricoma tector bicelular-TTB, face abaxial foliar: tricoma tector unicelular-TTU. 200x.

As secções transversais da lâmina foliar apresentaram a face adaxial e abaxial uniestratificada, com células menores na face abaxial, apresentando mesófilo dorsiventral constituído por parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico esta voltado para face adaxial e parênquima lacunoso na face abaxial. O parênquima paliçádico é constituído por apenas uma camada de células paliçádicas longas, espaçadas entre si, ricas em cloroplastos e dispostas perpendicularmente à superfície da lâmina foliar, ocupando, aproximadamente, a metade da estrutura (Figura 3). O parênquima

lacunoso é constituído de células irregulares, apresentando quatro a cinco camadas de célula dispostas paralelamente à superfície das células epidérmicas, com um sistema amplo de espaços intercelulares (Figura 3) e neles se mantém o vapor de água e o dióxido de carbono (CO₂) utilizável na fotossíntese. Portanto esta estruturação permite que uma grande superfície das células entre em contato com o ar existente no interior da folha, possibilitando a utilização do gás carbônico no processo fotossintético (Damião Filho 1993).

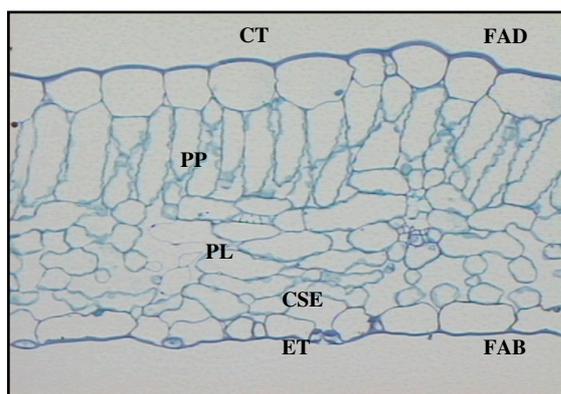


FIGURA 3. Anatomia foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Mesófilo foliar: face abaxial – FAB, cutícula – CT, parênquima paliçádico – PP, parênquima lacunoso – PL, face adaxial – FAD, estômato – ET, cutícula – CT, câmara subestomática – CSE, parênquima lacunoso – PL (Secções transversais da lâmina foliar). 200x.

A especialização do parênquima paliçádico, que determina maior eficiência fotossintética, deve-se não só a um maior número de cloroplastos nas células, como também a um sistema bem desenvolvido de espaços intercelulares, que permitem um rápido intercâmbio gasoso. A relação entre a superfície interna da folha, superfície celular que está em contato com o ar, e a superfície externa, que se encontra diretamente exposta ao meio, tem fundamental importância ecológica (Fahn 1978).

Em ambas as superfícies das células epidérmicas, há uma cutícula delgada revestindo-as, e apresenta, na região da nervura das células, formato arredondado e tamanho mais uniforme.

A nervura central apresenta um colênquima do tipo anguloso na região subepidérmica é composto por cerca de seis

camadas, com espaços intercelulares reduzidos até a região da face abaxial (Figura 4).

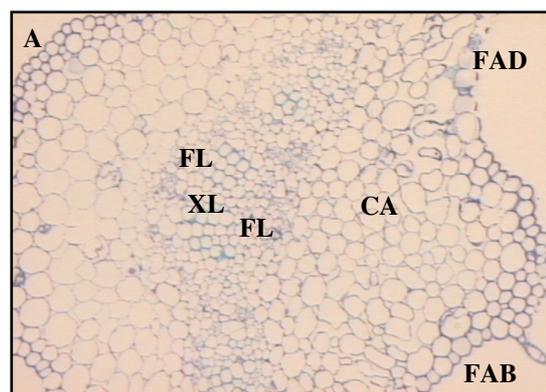


FIGURA 4. Anatomia foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Nervura central da lâmina foliar: colênquima angular – CA, floema – FL e xilema – XL. Face adaxial – FAD, e face abaxial – FAB. 200x.

Através de cortes transversais da raiz, observou-se a presença de periderme, composta por três a cinco camadas de células estreitas e compactas, resultantes da atividade do felogênio, não sendo possível delimitar o súber, felogênio e feloderma. O xilema secundário contém elementos de vasos com tamanhos irregulares, podendo-se observar placas de perfuração compostas e células parenquimáticas com paredes espessadas, dispersas entre esses. Foi observada a presença de laticíferos no xilema secundário. Observam-se o floema, externamente ao xilema, composto de fibras e células parenquimáticas pequenas estreitas e dispostas de modo compacto (Figura 5A e 5B). Alguns autores (St-Pierre *et al.* 1999, Samanani & Facchini 2006), demonstraram em vinca que a rota biossintética de vinblastina ocorre em células epidérmicas de folha, caules jovens, que se localizam em células laticíferos e idioblastos.

A raiz apresenta contorno aproximadamente circular (Figura 5A e 5B), com floema externo mais desenvolvido que o interno, mostrando todos os seus elementos (elementos ou tubos crivados, células companheiras e parênquima).

O córtex demonstra desenvolvimento regular, células com paredes espessadas irregulares tanto na forma quanto no tamanho.

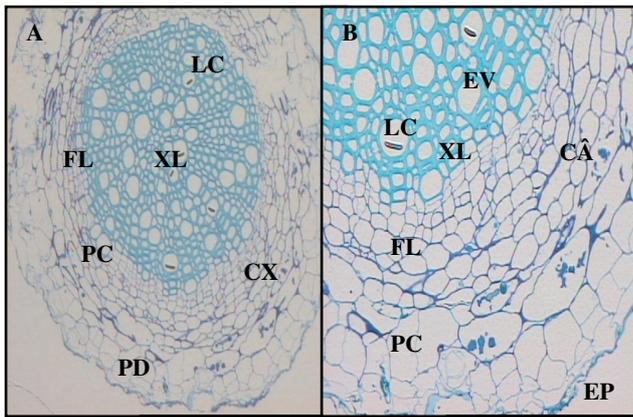


FIGURA 5. Anatomia foliar e radicular de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Corte transversal da raiz em estrutura secundária (A): periciclo – PC, periderme – PD, côrtex – CX; Floema secundário – FL, xilema primário – XL. 100x. Corte transversal da raiz em estrutura secundária (B): xilema secundário – XL, laticíferos – LC, câmbio vascular – CÂ, elementos vasos – EV, floema secundário – FL, periciclo – PC, epiderme – EP. 200x.

O cilindro central composto por diversas camadas de células, formado pelo câmbio vascular, tecidos vasculares secundários e o xilema primário, no centro do órgão, com presença de células laticíferas (Figura 5B). Pacheco (1980) evidenciou em raiz de vinca, fibras não lignificadas isoladas ou em grupos no periciclo. O mesmo observou no sistema vascular, presença de plastídios. Estes têm função de reserva e geralmente ocorrem no côrtex, sistema vascular e parênquima medular (Esaú 1974).

Segundo Roth (1976), o câmbio vascular produz os tecidos vasculares, xilema para o centro e floema para a periferia. A região cambial diferenciada na frente de cada um dos três pólos, do protoxilema formou os raios medulares. A raiz da vinca apresenta na região cambial, raios medulares do tipo tetraarca (Figura 5B). As raízes de dicotiledôneas se apresentam comumente como diarcas, triarcas, tetraarcas ou pentarcas, enquanto nas monocotiledôneas são quase sempre poliarcas.

O crescimento secundário de raízes pode ocorrer em dicotiledôneas herbáceas. Entretanto, o montante do crescimento varia nas diferentes espécies, assim como variam a composição histológica dos tecidos e os caracteres de constituição da periderme enfatiza (Esaú 1985).

Através dos testes histoquímicos evidenciou-se a presença de alcalóides nas células do mesófilo devido à coloração castanho

escuro decorrente da reação positiva com o reagente de Dragendorff (Figura 6A), e também na raiz pode-se observar a presença de alcalóides por meio da coloração castanhos escuros (Figura 6B). De acordo com Schnepf (1974), toda célula é secretora, pois muitos compostos podem ser transportados e secretados pelas células, tais como açúcares, hormônios, compostos nitrogenados e sais.

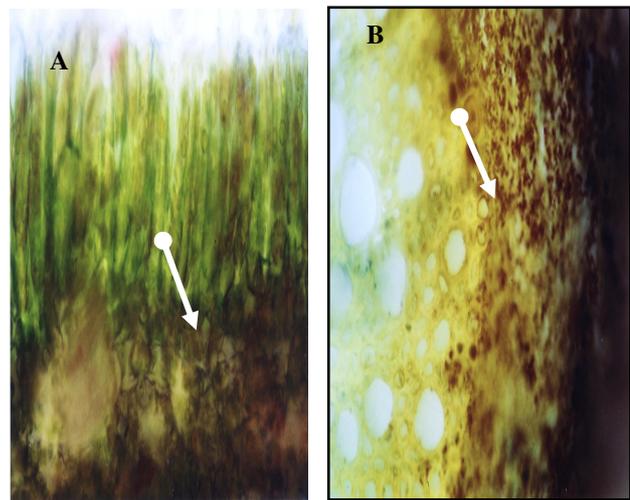


FIGURA 6. Detecção histoquímica. Corte transversal da lâmina foliar (A) e da raiz (B) de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don): coloração castanha escura (→) indicando presença de alcalóides. 200x.

Foi verificada após aplicação do reagente vermelho de rutênio, a presença de substâncias pécticas nas paredes das células epidérmicas e na célula basal dos tricoma tectores, resultando em coloração rosa (Figura 7).

A partir dos testes histoquímicos, há evidências de compostos fenólicos em diferentes tecidos da folha, observados, também, no mesófilo, devido à coloração verde-azulada escura (Figura 8).

Os compostos fenólicos são grupos heterogêneos de substâncias presentes, em quase todos vegetais, no vacúolo, citoplasma ou impregnados à parede celular (Esaú 1985 & Fahn 1979). Tais compostos estão relacionados à proteção da planta quanto ao dessecamento, ataque de animais, entre outros; embora ainda haja dúvidas quanto à totalidade de suas funções.



FIGURA 7. Detecção histoquímica. Corte transversal da lâmina foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don): coloração rosa (➔) indica presença de pectina. 100x.

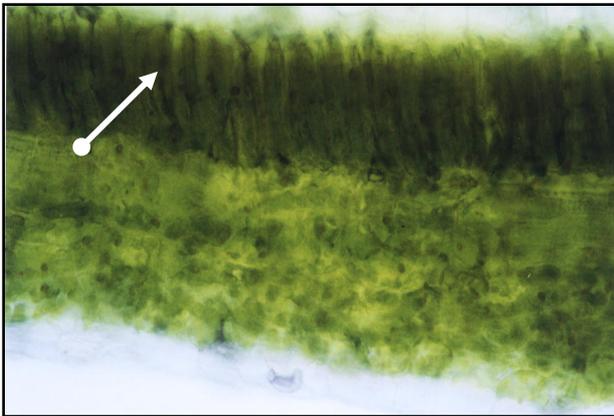


FIGURA 8. Detecção histoquímica. Corte transversal da lâmina foliar de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don): coloração verde-azulada escura (➔) indicando a presença de compostos fenólicos. 100x.

4 CONCLUSÃO

Concluindo, a lâmina foliar é anfiestomática, em ambas as faces há presença de apreciável número de estômato do tipo anomocíticos e paracítico, apresentando cutícula delgada revestindo-as, além de tricoma tectores unisseriados, unicelulares ou bicelulares. O mesófilo é dorsiventral constituído por parênquima paliádico e lacunoso, a nervura central apresenta um colênquima do tipo angular, um parênquima bastante desenvolvido e feixe vascular com organização do tipo colateral. A raiz apresenta sistema vascular bastante desenvolvido, e o contorno desta é aproximadamente circular, com floema externo mais desenvolvido que o interno. A raiz da vinca apresenta na região cambial, raios medulares do tipo tetrarca. Observou-se a

presença de laticíferos no xilema secundário. A presença de alcalóides foi observada na raiz e na lâmina foliar, verificando-se a ocorrência de substâncias pécnicas nas paredes das células epidérmicas, bem como evidência da presença de compostos fenólicos nas epidermes da lâmina foliar.

AGRADECIMENTOS

A UENF, pela concessão da bolsa e recursos para a execução deste trabalho. Agradecemos à Dr^a. Maura Cunha e da estagiária Tarsila pelo auxílio no processamento do material no laboratório de Botânica da UENF, à Dr^a. Edna Maria Mendes Aroucha pelas sugestões e críticas do texto final e pela revisão do abstract.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKISUE, G. OLIVEIRA, F. Farmacobotânica. São Paulo: *Pharmakon*, v.1, 1987. 263p.
- AZEVEDO, A. P. SILVA de. Contribuição ao estudo anatômico histoquímico da espécie *Datura suaveolens* Humb et Bompl. Ex. WILLD. Comparando o perfil fitoquímico de amostras coletada nos meses de março e junho. 1998. 67f. Monografia (Trabalho de Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1998.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 1982. 1032p.
- CUTTER, E. G. 1986. *Anatomia vegetal*. Parte II. Órgãos – experimentos e interpretação. São Paulo: Roca, 336p.
- DAMIÃO FILHO, C. F. *Morfologia Vegetal*. 1.ed., v.2000. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243p.
- ESAÚ, K. *Anatomia vegetal*. 3. ed. Barcelona: Omega, 1985. 779p.
- ESAÚ, K. *Anatomia das plantas com sementes*. Tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1974. 231p.

- FAHN, A. *Anatomia vegetal*. Madrid: H. Bumes, 1978. 643p.
- FAHN, A. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press Inc. 1979. 302p.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. Oxford. Pergamon Press. 1990.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E., MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900. 1991.
- JENSEN, W. A. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman & Co. 1962. 408p.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. 3.ed. New York: Paul B. Hoeber, Inc. 1940. 790p.
- LANGERON, M. *Précis de microscopie*. Paris: Masson & Cie, ed. 1949. 1430p.
- LUFFT, J. H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, v.171, p.347-368, 1971.
- MAHROUG, S., BURLAT, V., ST-PIERRE, B. Cellular and sub-cellular organization of the monoterpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews*, v.6, p.363-381, 2007.
- MANN, J. *Secondary metabolism*. 2.ed. New York: Oxford University. 1987. 374p.
- MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D. C., DIAS, J. E. *Plantas Medicináveis*. Viçosa: UFV. 1994. 220p.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1950.
- MING, L. C. *Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia*. Horticultura Brasileira, Botucatu, v.12, p.9-3, 1994.
- PACHECO, J. M. Contribuição ao estudo anatômico da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don var. (Apocynaceae), v. 32, n.52, p.39-54, 1980.
- ROTH, I. *Anatomia das plantas superiores*. 2.ed. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1976.357p.
- SAMANANI N., FACCHINI PJ. *Compartmentalization of plant secondary metabolism*. En Romeo JT (Ed.) Recent advances in Phytochemistry. Elsevier. Oxford: RU, 2006. pp: 5383.
- SOTTOMAYOR M., LOPES CARDOSO I., PEREIRA L.G, BARCELÓ. A Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry. Rev.* 3: 159-171, 2004.
- ST-PIERRE, B., VAZQUEZ-FLOTA, F.A., LUCA, V. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, v.11, p.887-900, 1999.
- WERKER, E., FAHN, A. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure, and secretion. *Chicago: Botanical Gazette*, v.142, n. 4, p. 461-476, 1981.
- YODER, L.R., MAHLBERG, P.G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63:1167-1173. 1976.

[1] – Licenciada em Biologia, Mestre em Produção Vegetal. Rua Hugo Correia Paes, Cond. Arte Vida, Edf. Bairo, Apt. 605 Gruta de Lourdes – Maceió – AL. Cep: 57050-730 Maceió - AL, Brasil. E-mail: celiaroucha@yahoo.com.br.

[2] – Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Associado, Departamento de Fitotecnia/UENF, RJ, Brasil.

[3] – Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professora Adjunto, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

[4] - Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Instituto Federal de Alagoas Campus Satuba, Rua 17 de Agosto, s/n Bairro: Zona Rural CEP: 57120-000. Satuba - AL