

## Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal

Arquimedes G. JUNIOR<sup>1</sup>, Izabel C. P. FERREIRA<sup>2</sup>, Celso V. NAKAMURA<sup>3</sup>,  
Benedito P. D. FILHO<sup>3</sup>, Ezilda JACOMASSI<sup>4</sup>, Maria C. M. YOUNG<sup>5</sup> e Diógenes A. G. CORTEZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Mestrando em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, <sup>3</sup> Departamento de Análises Clínicas,  
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Paranaense (UNIPAR),

Instituto Superior de Ciências Farmacêuticas e Bioquímica, Umuarama, PR, Brasil.

<sup>5</sup> Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

**RESUMO.** *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), conhecida como guanandi é popularmente utilizada para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas. Neste estudo, foram determinadas as características botânicas e físico-química para o *C. brasiliense*, com o objetivo de auxiliar a sua identificação taxonômica e o controle de qualidade de produtos preparados com esta planta. Para a caracterização da morfologia, anatomia e histoquímica foram confeccionadas lâminas semipermanentes do caule e das folhas do *C. brasiliense*. Testes histoquímicos realizados mostraram a presença de compostos fenólicos principalmente localizados nos canais secretores do caule, pecíolo e limbo. Os dados obtidos determinaram os parâmetros para avaliação de qualidade e pureza.

**SUMMARY.** "Anatomical study of leaves and stem of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), a contribution to the pharmacognostic study of vegetal drug". *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), a folk medicine plant known as "guanandi", is popularly used in the treatment of rheumatism, varicosity, hemorrhoids and chronic ulcerations. This study determines botanical and physico-chemical characters of *C. brasiliense*, with the objective of providing tools for its taxonomical identification and the quality control of derivatives products. For morphological, anatomical and histochemical characterizations semi-permanent slides has been made from *C. brasiliense* stem and leaves. Histochemical tests demonstrated the presence of phenolic compounds mainly localized on the secretory canals of stem, petiole and leaf blade. These data shown to be useful to the identification and quality parameters and purity.

### INTRODUÇÃO

A família Clusiaceae (Lindl.) inclui 50 gêneros e 1200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais do globo. Entretanto, alguns gêneros se desenvolvem com grande facilidade nas regiões norte de zonas temperadas. Esta família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas. A maioria das espécies está distribuída em três gêneros: *Hypericum* L. (350 spp), *Clusia* L. (200 spp) e *Garcinia* L. (200 spp)<sup>1</sup>. No entanto, o gênero *Calophyllum* L., cuja maioria das espécies são representadas por árvores tropicais, apresenta entre 180 a 200 espécies de grande interesse econômico, devido a produção de madeiras no-

bras<sup>2</sup>. Os gêneros mais importantes no Brasil são: *Kielmeyera* Mart. & Zucc. (pau-santo), *Ca-raipa* Aubl, *Patonia* R. Wight (obacuri), *Clusia* L., *Hypericum* L., *Rheedia* L., *Calophyllum* L., destacando-se quantitativamente o *Calophyllum brasiliense* Camb<sup>3</sup>, espécie conhecida popularmente como guanandi ou jacareúba, cuja infusão da casca é um remédio popular utilizado para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas<sup>4</sup>.

*Calophyllum brasiliense* Cambess. é uma espécie arbórea, com altura variando entre 20 a 30 metros e diâmetro de 40 a 60 cm<sup>5</sup>, que se desenvolve preferencialmente em florestas semidecídua, ombrófila densa, amazônica e no cerrado constituinte de vários estados do Brasil<sup>6</sup>.

As folhas são simples na forma do limbo, a

**KEYWORDS:** Anatomy, *Calophyllum brasiliense*, Clusiaceae.

**PALAVRAS CHAVES:** Anatomia, *Calophyllum brasiliense*, Clusiaceae.

\* Autor para correspondência. E-mail: dagcortez@uem.br

maioria é elíptica, obtusa no ápice e cuneiforme na base <sup>4</sup>. O padrão de venação é do tipo paxilato <sup>7</sup>, ou seja, com nervuras secundárias numerosas, paralelas e muito próximas uma das outras. Esse tipo de venação é citado por Melville <sup>7</sup>, para o *C. inophyllum* L. No entanto, Mouton <sup>7</sup> denomina este padrão de venação como de paralelódromo transverso, e Rizzini <sup>8</sup> de venosa obliquivênica.

Segundo Cronquist <sup>1</sup> uma das características anatômicas marcantes da família Clusiaceae é a presença de canais e cavidades secretores esquizógenos em todos os tecidos, onde são elaborados e secretados diversos metabólitos secundários. Suas folhas apresentam cavidades secretoras resiníferas, sendo algumas delas produtoras de resinas aromáticas que, somadas aos canais secretores, promovem o acúmulo de diversos tipos de metabólitos secundários, tais como xantonas e cumarinas <sup>9,10</sup>, podendo estar na forma isolada ou agrupar-se com cristais de oxalato de cálcio.

Diversas cumarinas e xantonas isoladas de representantes do gênero *Calophyllum* apresentaram importantes atividades moluscicida, antitumoral, antiviral e antimicrobiana <sup>11-14</sup>. Sartori *et al.* <sup>15</sup> comprovaram efeito citoprotetor, anti-secretor e antiúlcera da fração diclorometano obtida da casca do *C. brasiliense* Cambess. Da Silva *et al.* <sup>16</sup> comprovaram atividade analgésica e antiinflamatória das frações obtidas do extrato das folhas do *C. brasiliense* Cambess.

Recentemente, Gasparotto Junior <sup>17</sup> comprovou atividade moluscicida do extrato, frações e de uma cumarina isolada das folhas do *Calophyllum brasiliense* Cambess. apresentando a mesma intensa atividade moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata*, importante vetor da Esquistossomose Mansônica no Brasil.

Segundo Oliveira *et al.* <sup>18</sup>, outro fator importante para a diagnose de drogas vegetais, além da descrição anatômica, corresponde às inclusões celulares tanto de natureza orgânica (amido, compostos fenólicos, gotículas de óleo, etc) como inorgânicas (cristais de oxalato de cálcio, carbonato de cálcio, etc), e estas inclusões podem ser evidenciadas por meio de reações histoquímicas adequadas.

O presente trabalho tem por objetivo o estudo da anatomia e histoquímica das folhas e caule do *Calophyllum brasiliense* Cambess., visando estabelecer: 1) características marcantes para sua identificação; 2) dar subsídio para a análise farmacognóstica permitindo o controle de qualidade da droga vegetal.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico, folhas e caule do *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae) foram coletados na Ilha do Cardoso, localizada no Estado de São Paulo, pela professora Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Young, em março de 2001. A exsiccata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob o número de registro SP363818.

Para a análise microscópica do material botânico foram realizados cortes transversais, longitudinais e paradérmicos, à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear.

Lâminas semipermanentes foram preparadas com os cortes descorados em solução de hipoclorito de sódio 33%, lavados com água destilada, corados com safranina 1% e solução de azul de astra 1%, montados em lâmina e lamínula, com gelatina glicerizada (solução 1:1) <sup>18-20</sup> e observados em microscópio ótico Nikon (ALPHA-PHOT -2) YS2-T.

Para os testes histoquímicos, os cortes do material botânico foram submetidos: à solução aquosa de cloreto férrico 10%, para localização de compostos fenólicos <sup>19</sup>; à solução de floroglucinol ácido, para evidenciar paredes lignificadas <sup>20</sup>; à solução de Sudan IV (solução saturada do corante em álcool 95% e adicionada igual quantidade de glicerina), para localizar paredes suberificadas, cutinizadas e outros materiais lipídicos <sup>21</sup>; ao reagente de Lugol (água destilada 100,0 ml para 1,0 g de iodeto de potássio), para localização de amido <sup>22</sup>; à solução de azul de metileno (solução de 0,3 g de azul de metileno em 20,0 ml de álcool 96°GL, e completando com água destilada para 100,0 ml) para evidenciar estruturas celulósicas e mucilaginosas <sup>23</sup>; à solução de ácido sulfúrico diluído de 5-10%, para evidenciar cristais de oxalato de cálcio; e à solução de vermelho de rutênio para evidenciar a presença de células de conteúdo mucilaginoso <sup>24</sup>.

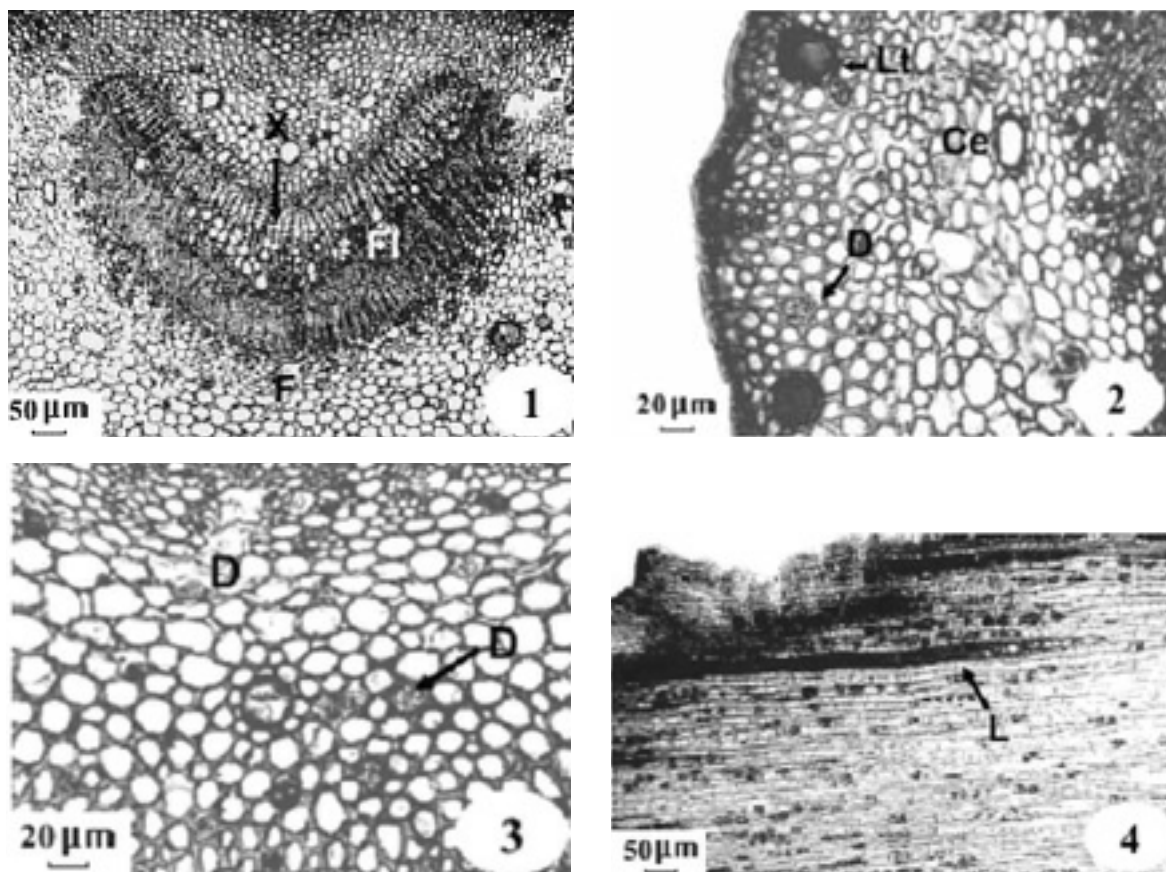
Os aspectos anatômicos das folhas e caule foram observados, descritos e ilustrados ao microscópio óptico. As fotomicrografias e as escalas referentes às ilustrações foram obtidas utilizando-se do programa Image-pro<sup>®</sup> Lite (version 3.0 for windows/98) acoplado ao microscópio ótico Leika DMLS type 020-518.5000 e devidamente ajustado por meio de pré-calibração.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Descrição Microscópica*

#### *Folha*

*Calophyllum brasiliense* apresenta pecíolo dorsiventral com sistema vascular formado por

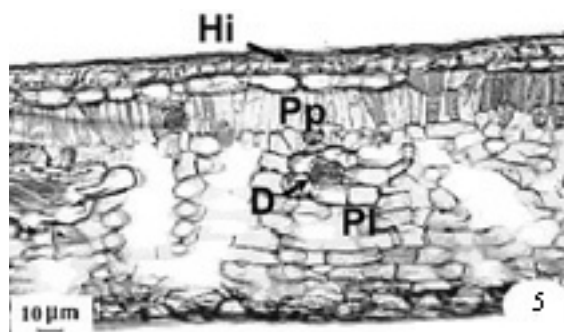


**Figuras 1-4:** Seções transversais e longitudinal do pecíolo de *Calophyllum brasiliense* Cambess. **1:** sistema vascular; **2:** evidenciando o córtex; **3:** evidenciando as drusas; **4:** secção longitudinal evidenciando laticífero (Ce - canal esquizógeno, D - drusas, F - fibras perivasculares, FI - floema, L - laticífero, X - xilema).

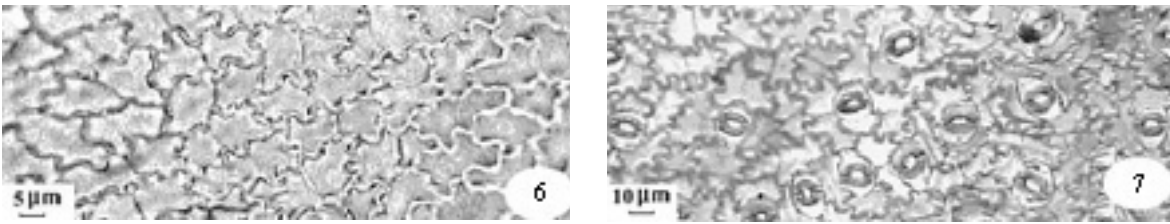
único feixe colateral. Na face dorsal, possui grupos de fibras associados ao floema (Fig. 1). O sistema fundamental é composto em sua maior parte por parênquima colenquimatoso, que se caracteriza por apresentar certo espessamento não lignificado na parede celular (Fig. 2). As drusas estão presentes por todo o sistema fundamental, bem como laticíferos e canais esquizógenos, sendo estes últimos também localizados no sistema vascular (Figs. 3-4). Metcalfe & Chalk <sup>25</sup> relatam estas estruturas para algumas espécies da família Clusiaceae. O tipo de pecíolo do *C. brasiliense* observado se enquadra com o tipo de *C. calaba* Jacq., descrito por Metcalfe & Chalk <sup>25</sup>.

Em secção transversal, o limbo se mostra dorsiventral e hipoestomático com epiderme unisseriada acompanhada de hipoderme (Figs. 5-7), apresentando cutícula espessa em ambas as faces epidérmicas. O mesófilo é composto por uma camada de células em paliçada, uma camada de células coletoras cuneiformes e nove a onze camadas de células com formatos irregulares, constituindo o parênquima lacunoso. Nes-

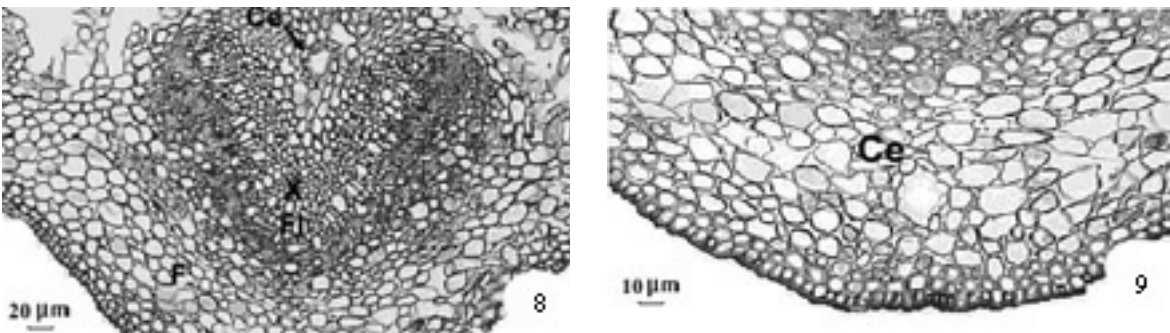
ta região observou-se a presença de cristais de oxalato de cálcio, e principalmente as drusas. Especialmente nas regiões das nervuras de menor calibre, o parênquima paliçádico pode ser formado por duas camadas de células mais curtas. Metcalfe & Chalk <sup>25</sup> descrevem algumas características do limbo de representantes da família Clusiaceae, tais como: hipoderme com uma a



**Figura 5.** Secção transversal do mesófilo do *Calophyllum brasiliense* Cambess evidenciando hipoderme, parênquima paliçádico, lacunoso e drusas (Pp: parênquima paliçádico, Hi: hipoderme, Pl: parênquima lacunoso, D: drusa).



**Figuras 6 e 7:** Seções paradérmicas da folha do *Calophyllum brasiliense* Cambess. **6:** Face adaxial evidenciando contorno das células; **7:** Face abaxial evidenciando estômatos.



**Figuras 8 e 9:** Seções transversais da nervura principal do *Calophyllum brasiliense* Cambess. **8:** evidenciando o sistema vascular; **9:** evidenciando canal esquizógeno (Ce: canal esquizógeno, F: fibras perivasculares, FI: floema, X: xilema).

várias camadas de células em contato com a face adaxial da epiderme em muitos gêneros, inclusive *Calophyllum*; cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas no mesofilo; folha dorsiventral em muitos gêneros e cêntrica e subcêntrica em outros.

A nervura principal na face abaxial é convexa com sistema vascular representado por um feixe colateral em forma de arco, circundado por um anel de fibras (Fig. 5); apresenta canais esquizógenos na face abaxial associado ao parênquima colenquimatoso bem como na região central (Figs. 8 e 9). Em ambas as faces da nervura principal ocorrem idioblastos com monocristais prismáticos e drusas.

Na região do bordo, a cutícula é mais espessa e a epiderme é formada por uma camada de células com tamanho menor, quando comparadas as demais células epidérmicas. O sistema vascular nesta região é representado por um feixe colateral, associado a um canal esquizógeno envolvido por bainha de esclerênquima.

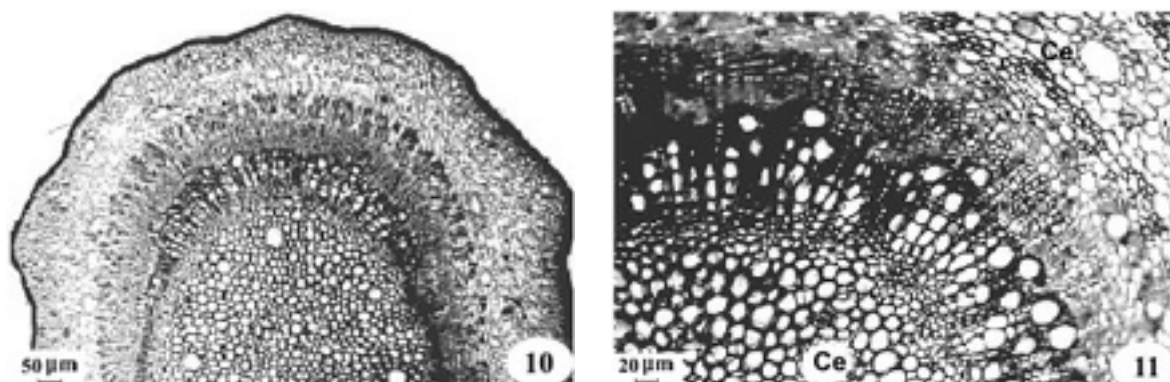
Em cortes paradérmicos, observa-se em ambas as faces epidérmicas células de formatos variados e contorno das paredes anticlinais ondulados (Figs. 8 e 9). Os estômatos são numerosos, do tipo anomocítico, e estão presentes unicamente na face abaxial (Fig. 9). Metcalfe &

Chalk<sup>25</sup> descrevem para alguns representantes da família Clusiaceae estômatos paracíticos presentes na face abaxial da epiderme.

### **Caule**

O caule em desenvolvimento primário (3 mm de diâmetro) apresenta contorno retangular com epiderme unisseriada constituída por células retangulares e papiliformes com cutícula espessa. O córtex é formado por tecido parenquimático e o sistema vascular é representado por um cilindro contínuo de floema ao redor do xilema, o qual está envolto por grupos de fibras perivasculares; a região central do caule se mostra constituída por células parenquimáticas isodiamétricas em processo de lignificação, e os canais esquizógenos são observados na região cortical e medular (Figs. 10 e 11). Da mesma forma, foram observados a presença de idioblastos com microcristais prismáticos e, em maior evidência, as drusas.

Estes resultados estão de acordo com o relatado por Metcalfe & Chalk<sup>25</sup> e Metcalfe<sup>26</sup> referente à presença de canais ou cavidades secretoras em espécies da família Clusiaceae, que podem seguir o feixe vascular ou correr independente deste no mesofilo, passando pela região medular e cortical do pecíolo.



**Figs. 10-11:** Secções transversais do caule em desenvolvimento primário do *Calophyllum brasiliense* Cambess. **10:** evidenciando sistema vascular e canais esquizógenos centrais e periféricos; **11:** evidenciando canais esquizógenos.

Parte da planta	Testes Histoquímicos						
	Lugol	Sudan IV	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FeCl <sub>3</sub>	Azul de Metileno	Floroglucinol	Vermelho De Rutênio
Caule							
Primário	+	++	+++	+++	++	+++	++
Pecíolo	+	++	+++	+++	++	++	++
Limbo	+++	++	+++	+++	+++	++	+++

**Tabela 1.** Resultados dos testes histoquímicos para material seco de *Calophyllum brasiliense* Cambess. + fracamente positivo; ++ moderadamente positivo; +++ fortemente positivo; - negativo.

### Testes Histoquímicos

Os resultados dos testes histoquímicos com o *C. brasiliense* (Tabela 1) demonstraram, após a utilização do FeCl<sub>3</sub>, a presença marcante compostos fenólicos, principalmente localizados em canais secretores esquizógenos apresentados pela espécie. Segundo Metcalfe & Chalk<sup>25</sup>, a natureza química do conteúdo das estruturas secretoras tem sido afirmada sem a utilização de testes histoquímicos adequados. No entanto, testes aplicados por diferentes pesquisadores para o mesmo material podem levar a diferentes conclusões, já que o material secretado raramente é constituído por substâncias puras. Com a utilização do Sudan IV observou-se a deposição de compostos graxos, notoriamente na espessa cutícula apresentada pela espécie. A utilização do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comprovou a intensa presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de microcristais prismáticos e drusas dispersas tanto na folha quanto no caule primário. Com a utilização do Floroglucinol ácido, evidenciou-se a presença de paredes lignificadas principalmente no caule primário, justificando a existência em maior quantidade de tecidos de sustentação neste lo-

cal. A utilização do Azul de Metileno e do Vermelho de Rutênio revelou a presença de tecidos não lignificados com conteúdo mucilaginoso, principalmente localizados no limbo da espécie.

### CONCLUSÃO

Os dados obtidos com o estudo da anatomia e histoquímica, para a espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess., foram importantes para sua identificação e avaliação do controle de qualidade, sendo úteis para comercialização desta espécie como droga vegetal.

**Agradecimentos.** A CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cronquist, A. (1981) "An integrated system of classification of flowering plants". Columbia University Press, New York, págs. 337.
2. Mckee, T.C., Covington, C.D., Fuller, R.W., Bokesch, H.R., Young, S., Cardellina, J.H., Kadushin, M.R., Soejarto, D.D., Stevens, P.F., Cragg, G.M., Boyd, M.R. (1998) *J. Nat. Prod.* **61**: 1252-6.

3. Joly, A.B. (1975) "*Botânica: introdução a taxonomia vegetal*", Ed. Nacional, Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2ª ed., págs. 428.
4. Corrêa, M.P. (1978) "*Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*", Imprensa nacional, Rio de Janeiro, Vol. 3, págs. 388.
5. Lorenzi, H. (1992) "*Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*", Plantarum, Nova Odessa, 2 ed, págs. 352.
6. Carvalho, P.E.R. (1994) "*Espécies florestais brasileiras. recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*", Embrapa - Cnpf, Brasília, págs. 640.
7. Melville, R. (1976) *Taxon* **25**: 549-61.
8. Rizzini, C.T. (1960/1961) *Rodriguésia* **35**: 193-211.
9. Cardona, M.L., Fernandes, I., Pedro, J.R. & Serrano, A. (1990) *Phytochemistry* **29** (9): 3003-6.
10. Cortez, D.A.G., Marston, A., & Hostettmann, K. (1999) *Chromatographia* **50** (1/2):7-10.
11. Ravelonjato, B.; Libot, F., Ramiandrasoa, F., Kunesch, N., Gayral, P., & Poisson, J. (1992) *Planta Med.* **58**: 51-5.
12. Guilet, D., Hélesbeux, J.J., Séraphin, D., Sévenet, T., Richomme, P., & Bruneton, J. (2001) *J. Nat. Prod.* **64**: 563-8.
13. Dharmaratne, H. R. W., Tan, G.T., Marasinghe, G.P.K., & Pezzuto, J.M. (2001) *Planta Med.* **68**: 86-7.
14. Sakagami, Y., Kajimura, K., Wijesinghe, W.M. N.M., & Dharmaratne, H.R.W. (2002) *Planta Med.* **68**: 541-3.
15. Sartori, N.T., Canapelle, D., De Sousa Jr, P.T., & Martins, D.T.O. (1999) *J. Ethnopharmacol.* **67**: 149-56.
16. Da Silva, K.L., Dos Santos, A.R.S., Mattos, P.E.O., Yunes, R.A., Delle-Monache, F., & Cechinel-Filho, V. (2001) *Therapie* **56**: 431-4.
17. Gasparotto Junior, A. (2003) "*Estudo botânico fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da espécie vegetal Calophyllum brasiliense (Camb.)-Clusiaceae*", Departamento de Farmácia e Farmacologia /Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Dissertação de mestrado, págs. 118.
18. Oliveira, F. de, K. Akisue & M.K. Akisue (1998) "*Farmacognosia*", Ed. Atheneu, págs. 412.
19. Johansen, D.A. (1940) "*Plant microtechnique*", McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, págs. 523.
20. Sass, J.E. (1951) "*Botanical microtechnique*", State Coll. Press. Ames, Iowa, 2ª ed., págs. 228.
21. Rawlins, T.E. & W.N. Takahashi (1952) "*Technics of plant histochemistry and virology*", The National Press, Millbrae, págs. 238.
22. Berlyn, G.P. & J.P. Miksche (1976) "*Botanical microtechnique and cytochemistry*", The Yowa State University, Ames (Iowa), págs. 331.
23. Costa, A.F. (1972) "*Farmacognosia (Farmacognosia Experimental)*", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Vol. III, págs. 823.
24. Jensen, W.A. (1962) "*Botanical histochemistry: principles and pratics*", San Francisco: W.H.Feeman, págs. 408.
25. Metcalfe, C.R. & L. Chalk (1957) "*Anatomy of the Dicotyledons - leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*", Clarendon Press, Oxford, Vol. 1, págs. 724.
26. Metcalfe, C.R. (1983) "*Secreted mineral substances*", In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. Anatomy of the dicotyledons, Clarendon Press, Oxford, Vol. 1, págs. 82-97.