



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camilla Ribeiro Alexandrino

**Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica**

Rio de Janeiro

Julho, 2016

Camilla Ribeiro Alexandrino

**Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica**



Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Maura Da Cunha

Coorientadora: Dra. Cátia Henriques Callado

Rio de Janeiro

Julho, 2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

Alexandrino, Camilla Ribeiro.

Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica / Camilla Ribeiro Alexandrino. – 2016.

161 f. : il.

Orientadora: Maura da Cunha.

Coorientadora: Cátia Henriques Callado.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Rubiaceae - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 2. Palicourea - Teses. 3. Plantas medicinais - Teses. 4. Mata Atlântica - Teses. I. Cunha, Maura da. II. Callado, Cátia Henrique. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.972(815.3)

A382

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Camilla Ribeiro Alexandrino

**Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies do gênero *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Vegetal.

Realizado em 25 de julho de 2016.

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maura Da Cunha (Orientadora)

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cátia Henriques Callado (Coorientadora)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Sebastião José da Silva Neto

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Ricardo Cardoso Vieira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena Regina Pinto Lima

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Rio de Janeiro

Julho, 2016

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e irmão por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu.

À Dr<sup>a</sup> Maura Da Cunha não só pela orientação, mas principalmente pela amizade, proteção, amor, carinho e confiança no meu trabalho.

À minha co-orientadora Cátia Callado pela dedicação e por me receber no laboratório.

Aos pesquisadores Sebastião Neto e Carla Manão pela colaboração, identificação e coleta das espécies estudadas.

As técnicas dos laboratórios Beatriz, Giovana, Jeanne e Silvana pela ajuda na realização de diversas etapas deste trabalho e pela amizade estabelecida.

Aos professores que colaboraram proporcionando espaço nos laboratórios com as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Edésio de Melo, Mário Geraldo, Valdirene Gomes, Helena Lima e Guilherme Rabelo.

Aos amigos do setor de Anatomia Vegetal da UENF: Fernanda Trindade, Glaziele Campbell, João Victor Castelar, Jonas Marques, Kathlyn Gevú, Maria Isabel Titoneli, Rodrigo Feitoza, Saulo Pireda, Vanessa Xavier e Warlen da Costa. Aos amigos do laboratório de química da UFRRJ: Ilna, Débora e Carlos. Assim como as amigas do laboratório de Anatomia vegetal da UERJ: Thaís, Kely, Maxmira e Renata. Obrigada pela convivência e por me aturarem em todas as fases do meu humor!

Aos amigos de longa data por estarem ao meu lado apesar da distância.

Aos meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

“Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de montanhas, florestas, povoados. E vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira... O rio não pode voltar, ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entrar é que o medo desaparece. Porque só assim o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano.”

*(Osho)*

## RESUMO

Alexandrino, C. R. Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica. 2016. 161f. Tese Doutorado em Biologia Vegetal- Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

*Palicourea* é um gênero neotropical predominantemente constituído por arbustos e subarbustos, com maior diversidade na América do Sul e Central. No Brasil, o gênero está representado por 56 espécies e seis subespécies, que ocorrem principalmente na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado. Os objetivos do presente estudo foram: (1) comparar a anatomia e micromorfologia das folhas de *Palicourea fulgens*, *P. guianensis*, *P. longipedunculata*, *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* e a importância destes parâmetros no aspecto taxonômico e ecológico de *Palicourea*; (2) testar o efeito tóxico dos extratos foliares de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* a fim de verificar a ação sobre a forma epimastigota do *Tripanossoma cruzi* e a atividade antifúngica dos extratos contra *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Fusarium solani*; (3) assim como, identificar micromoléculas desses extratos para corroborar com o perfil fitoquímico e quimiotaxonômico do gênero. O material vegetal foi coletado em locais de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. As amostras foram processadas e analisadas seguindo as técnicas usuais para microscopia óptica, eletrônica de varredura e transmissão e para testes histoquímicos. Os extratos foliares foram obtidos pela rotaevaporação seguida de fracionamentos e usados tanto nos testes de atividade antifúngica e antiparasitária quanto na prospecção química. As características anatômicas gerais observadas foram: presença de tricomas tectores unicelulares, lâmina foliar hipostomática, estômatos paracíticos e paralelocíticos, epiderme unisseriada, presença de papilas e idioblastos contendo feixes de ráfides. Os testes histoquímicos revelaram presença de lipídeo, amido, composto péctico e lignina. As análises estatísticas permitiram segregar espécies por estrutura da folha e inferir a relação de afinidade entre as espécies analisadas. E permitiram, ainda, observar aspectos da plasticidade fenotípica das folhas. Os ensaios biológicos revelaram considerável efeito dos extratos sobre a forma epimastigota do *T. cruzi*, porém nenhum dos extratos testados foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* e do fungo filamentosso *F. solani*. Os espectros de ressonância revelaram a presença de cumarinas no extrato acetato de etila de *P. rudgeoides* e as placas cromatográficas indicaram a possível presença também em *P. marcgravii* e *P. tetraphylla*. O perfil quimiotaxonômico revelou uma tendência na produção de alcaloide iridoídico em *Palicourea*. Tais resultados evidenciam o potencial da caracterização anatômica e química da folha para a circunscrição de Palicoureeae e colaboram com a sistemática de Rubiaceae indicando tendências anatômicas e químicas para a tribo.

Palavras-chave: Anatomia foliar. Ultraestrutura. Palicoureeae. Composição química.

## ABSTRACT

Alexandrino, C. R. Characterization of the structure, phytochemistry and biological activity of leaf extracts of species of *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) of the Atlantic Forest. 2016. 161f. Thesis PhD in Plant Biology - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

*Palicourea* is a Neotropical genus of predominantly shrubs and subshrubs and is most diverse in South and Central America. In Brazil, the genus is represented by 56 species and 6 subspecies, which occur mainly in the Amazon Forest, Atlantic Forest and the Cerrado. The objective of the present study was to compare the anatomy and micromorphology of the leaves of six species of *Palicourea* from the Atlantic Forest, and discuss the importance of these parameters to the taxonomy and ecology of the genus. The toxic effects of the leaf extracts of *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* and *P. tetraphylla* against the epimastigote form of *T. cruzi*, and antifungal activity against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *F. solani*, were tested. Additionally, the study aimed to identify micromolecules of the extracts in order to corroborate the phytochemical and chemotaxonomical profile of the genus. The plant material was collected from sites in Atlantic Forest in southeastern Brazil. Preparation of the samples followed standard techniques for light, scanning electron and transmission electron microscopy and histochemical tests. Leaf extracts were obtained by rotary evaporation followed by fractioning and used in tests antifungal, antiparasitic activity and chemical prospecting. The general anatomical characteristics observed were: the presence of unicellular, tector trichomes; hypostomatic leaf blades; paracytic and parallelocytic stomata; uniseriate epidermis; papillae and idioblasts containing bundles of raphides. Histochemical tests revealed the presence of lipid, starch, lignin and a pectin compound. Statistical analyses segregated the species according to leaf structure and inferred an affinity among the analyzed species. These analyses also documented the phenotypic plasticity of the leaves. The biological tests revealed a considerable effect of the extract on the epimastigote of *T. cruzi*, but none of the tested extracts were able to inhibit the growth of the yeasts *C. albicans* and *C. tropicalis* or the filamentous fungus *F. solani*. The resonance spectra revealed the presence of coumarins in the ethyl acetate extract of *P. rudgeoides*, and the chematographic plates indicated their possible presence in *P. marcgravii* and *P. tetraphylla* as well. The chemotaxonomic profile revealed a tendency toward the production of iridoid alkaloid in *Palicourea*. These results show the potential of the anatomical and chemical characterization of leaves for the circumscription of Palicoureeae, and corroborate the systematic of Rubiaceae indicating anatomical and chemical trends for the tribe.

Keywords: Leaf anatomy. Ultrastructure. Palicoureeae. Chemical composition

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica do gênero <i>Palicourea</i> .....	26
Figura 2 -	Imagens de espécies do gênero <i>Palicourea</i> .....	29
Figura 3 -	Microscopia Eletrônica de Varredura de espécies de <i>Palicourea</i> .....	39
Figura 4 -	Microscopia Óptica - seção transversal e dissociação epidérmica da lâmina foliar de espécies de <i>Palicourea</i> .....	44
Figura 5 -	Microscopia Óptica - seção transversal da região intercostal de espécies de <i>Palicourea</i> .....	46
Figura 6 -	Microscopia Óptica - seção transversal da região mediana do pecíolo.....	48
Figura 7 -	Testes histoquímicos das folhas de espécies de <i>Palicourea</i> .....	50
Figura 8 -	Microscopia Eletrônica de Transmissão de espécies de <i>Palicourea</i> .....	52
Figura 9 -	Análise de agrupamento UPGMA.....	54
Figura 10 -	Análise de Componente Principal.....	56
Figura 11 -	Driagrama das etapas do fracionamento do extrato bruto metanólico das três espécies estudadas.....	66
Figura 12 -	Microscopia óptica de epimastigotas tratados com diferentes extratos aquosos de espécies de <i>Palicourea</i> .....	74
Figura 13 -	Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados por 24h com extratos aquosos a 100 µg/mL de diferente espécies de <i>Palicourea</i> ...	75
Figura 14 -	Diversidade química e distribuição dos principais constituintes nas três subfamílias: ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN) e Rubioideae (RUB).....	82
Figura 15 -	Exemplo de estruturas de substâncias que já foram isoladas no gênero	83

	<i>Palicourea</i> .....	
Figura 16 -	Diagrama do fracionamento do extrato aquoso de <i>P. tetraphylla</i> .....	87
Figura 17 -	Frações da coluna do extrato aquoso de <i>P. tetraphylla</i> .....	88
Figura 18 -	Diagrama do fracionamento do extrato em diclorometano de <i>P. tetraphylla</i> .....	89
Figura 19 -	Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de <i>P. rudgeoides</i> .....	90
Figura 20 -	Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de <i>P. marcgravii</i> .....	90
Figura 21 -	Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de <i>P. tetraphylla</i> .....	91
Figura 22 -	Diagrama do fracionamento do extrato metanólico de <i>P. marcgravii</i> .....	92
Figura 23 -	Placas cromatográficas com extratos em hexano, acetato de etila e metanol.....	93
Figura 24 -	Esquema da placa cromatográfica com extrato acetato de etila em eluentes hexano/acetato de etila (7:3) e aspergidas com reagente de Nadi	95
Figura 25 -	Placas cromatográficas aspergidas com vanilina sulfúrica.....	96
Figura 26 -	Esquema das placas cromatográficas com extrato metanólico em eluentes acetato de etila/acetona (3:7) e aspergidas com cloreto de alumínio.....	97
Figura 27 -	Esquemas e imagem de placas cromatográficas com extratos de acetato de etila, diclorometano e metanólico em eluentes hexano/acetato de etila (7:3), acetato de etila/acetona (3:7) e clorofórmio/metanol (9:1) aspergidas com cloreto de alumínio.....	99
Figura 28 -	Perfis cromatográficos evidenciando a similaridade dos extratos	100

	metanólicos das três espécies.....	
Figura 29 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do fitol ( <b>1</b> , $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).....	101
Figura 30 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da purpurina 18 fitil éster ( <b>2</b> , $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)	102
Figura 31 -	Estruturas das substâncias <b>3</b> ( $\text{MeO-d}_4$ ) e <b>4</b> (piridina- $\text{d}_5$ ).....	103
Figura 32 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da esculetina ( <b>3</b> , $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	103
Figura 33 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da esculetina ( <b>3</b> , $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	104
Figura 34 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da cichoriina ( <b>4</b> , piridina- $\text{d}_5$ , 400MHz).....	105
Figura 35 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da cichoriina ( <b>4</b> , piridina- $\text{d}_5$ , 400MHz).....	106

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeitos das incubações por 24h dos extratos de <i>P. marcgravii</i> sobre o crescimento dos epimastigotas.....	70
Gráfico 2 -	Efeitos das incubações por 24h dos extratos de <i>P. rudgeoides</i> sobre o crescimento dos epimastigotas.....	71
Gráfico 3 -	Efeitos das incubações por 24h dos extratos de <i>P. tetraphylla</i> sobre o crescimento dos epimastigotas.....	72
Gráfico 4 -	Cinética de eliminação dos epimastigotas usando o extrato aquoso de espécies de <i>Palicourea</i> .....	73
Gráfico 5 -	Perfil químico dos gêneros <i>Palicourea</i> e <i>Psychotria</i> .....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características gerais das três subfamílias atualmente reconhecidas na família Rubiaceae, com ênfase em gêneros neotropicais.....	24
Tabela 2 -	Espécies estudadas, abreviações, número de registro no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ) e no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (HUENF) e sítio de coleta com a respectiva altitude do ponto de amostragem.....	34
Tabela 3 -	Corantes usados nos testes histoquímicos.....	37
Tabela 4 -	Matriz de dados usados na análise de agrupamento e na análise de componentes principais.....	40
Tabela 5 -	Espécies estudadas, número de identificação no herbário e sítio de coleta	65
Tabela 6 -	Cinética de eliminação dos epimastigotas.....	72
Tabela 7 -	Quadro com os sistemas de eluentes e reveladores testados para as três espécies.....	85
Tabela 8 -	Rendimento do fracionamento dos extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água.....	93
Tabela 9 -	Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de <i>P. marcgravii</i> .....	94
Tabela 10 -	Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de <i>P. rudgeoides</i> .....	97
Tabela 11 -	Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de <i>P. tetraphylla</i> .....	98
Tabela 12 -	Valores de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN e correlações NOE das substâncias <b>3</b> (em CD <sub>3</sub> OD) e <b>4</b> (piridina-d <sub>5</sub> ).....	107

Tabela 13 - Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Palicourea</i> .....	116
Tabela 14 - Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Psychotria</i> .....	121
Tabela 15 - Relação do número de ocorrências, número de tipos e índice de diversidade.....	109
Tabela 16 - Quantificação do grau de proteção das hidroxilas flavonoídicas encontradas em <i>Palicourea rígida</i> .....	110

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	16
<b>1</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	18
1.1	A Mata Atlântica.....	18
1.2	A família Rubiaceae.....	21
1.3	Gênero <i>Palicourea</i> .....	26
1.4	Potencial Biológico e Químico do gênero <i>Palicourea</i> .....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	31
2.1	Geral.....	31
2.2	Específicos.....	31
<b>3</b>	<b>MORFOANATOMIA E ULTRAESTRUTURA FOLIAR.....</b>	32
3.1	Introdução.....	32
3.2	Material e Métodos.....	33
3.3	Resultados.....	38
3.4	Discussão.....	57
<b>4</b>	<b>ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIPARASITÁRIA DE <i>PALICOUREA MARCGRAVII</i>, <i>P. RUDGEOIDES</i> E <i>P. TETRAPHYLLA</i>.....</b>	63
4.1	Introdução.....	63
4.2	Material e Métodos.....	65
4.3	Resultados.....	69

4.4	<b>Discussão</b> .....	75
5	<b>ANÁLISE FITOQUÍMICA E QUIMIOSSISTEMÁTICA DE <i>PALICOUREA MARCGRAVII, P. RUDGEOIDES E P. TETRAPHYLLA</i></b>	78
5.1	<b>Introdução</b> .....	78
5.2	<b>Material e Métodos</b> .....	84
5.3	<b>Resultados</b> .....	92
5.4	<b>Discussão</b> .....	110
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	114
	<b>APÊNDICES</b> .....	116
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	125

## INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade pode ser definida como a variedade de formas de vida existentes no planeta. Existem estimativas de que cerca de 20% da diversidade biológica esteja presente em território brasileiro (BRASIL 2004) distribuída por seus diferentes biomas. Neste cenário temos a Mata Atlântica que figura entre os *hotspots* mais ameaçados do mundo tanto pelas mudanças climáticas quanto pela interferência humana. Apenas 11,6% de sua cobertura vegetal natural permanecem de forma bastante fragmentada, o que resulta em alta vulnerabilidade deste bioma e por isso é identificada como uma das principais prioridades de preservação biológica para os ecossistemas globais (MYERS et al. 2000; OLSON; DINERSTEIN 2002; SCARANO; CEOTTO 2015). Este bioma está distribuído ao longo da costa atlântica do país, atingindo áreas da Argentina e do Paraguai nas regiões Sudeste e Sul. No Brasil é formada por um conjunto de ecossistemas complexos e de grande importância por abrigar uma porcentagem significativa da diversidade biológica (STEHMANN et al. 2009; FUNDAÇÃO SOS FLORESTA ATLÂNTICA; INPE 2014).

Dentre as famílias botânicas que podem ser encontradas na Mata Atlântica pode-se destacar a Rubiaceae, que é uma das cinco mais ricas em número de espécies dentre as Angiospermae com, 13.000 espécies circunscritas a 620 gêneros (GOEVARTS, FRODIN, RUHSAM 2007). Suas espécies ocorrem em todos os continentes, mas a maioria está em áreas tropicais e subtropicais (ROBBRECHT 1988; GOEVARTS, FRODIN, RUHSAM 2007). Rubiaceae apresenta espécies como *Coffea arabica* L. de grande valor histórico e econômico, devido ao ciclo de exploração do café no Brasil e também espécies com potencial terapêutico importante, como as espécies de *Cinchona* que possuem o quinino usado no tratamento da malária (NEVES, 1974; CIC, 2009; BOULOS et al. 1997).

Nas últimas décadas a família sofreu várias alterações em sua classificação, pela influência de estudos filogenéticos moleculares, florísticos e revisões taxonômicas sobre Rubiaceae Neotropicais (DELPRETE; JARDIM 2012). A classificação taxonômica segue diferentes propostas de classificação. ROBBRECHT; MANEN (2006) incluem apenas duas subfamílias, a Cinchonoideae e a Rubioideae. Sendo Cinchonoideae dividida em três grupos: tribo Coptosapelteae, a supertribo Ixoridinae (14 tribos e alianças) e a supertribo Cinchonidinae (sete tribos e complexos). Por sua vez, Rubioideae é dividida em três grupos: Rubioideae basal (Colletoecema E.M.A. Petit e cinco tribos), a supertribo Psychotriidinae (seis tribos) e a supertribo Rubiidinae (oito tribos). Todavia, a classificação de BREMER; ERIKSSON 2009 retoma a divisão da família Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae,

Cinchonoideae e Ixoroideae (BREMER; JANSEN 1991; BREMER 1992, 1996; BREMER; ERIKSSON 2009; BREMER et al. 1995; ROVA et al. 1997; BREMER; MANEN 2000; ROVA et al. 2002), sendo esta a classificação utilizada neste trabalho. Além das mudanças em nível de subfamília, a definição do *taxa* nos demais níveis hierárquicos também tem sofrido modificações (ROVA et al. 2002; DELPRETE; CORTÉS 2004).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar aspectos anatômicos, ultraestruturais, fitoquímicos, atividade antifúngica e antiparasitária da folha de diferentes espécies de *Palicourea* oriundas de remanescentes de Mata Atlântica, visando contribuir para os estudos taxonômicos do gênero e, também, para o melhor conhecimento e preservação das áreas nativas desse bioma. Para isso, esta tese foi organizada em seis seções: As duas primeiras seções apresentam a fundamentação teórica dos temas abordados, o bioma Mata Atlântica, a família Rubiaceae, as características do gênero, as espécies estudadas, as áreas de estudo e os objetivos deste trabalho. A terceira seção apresenta os resultados relativos à morfoanatomia e ultraestrutura da folha de seis espécies de *Palicourea* e a relação intraespecífica das espécies analisadas. Os resultados obtidos nesta sessão foram submetidos à publicação na revista *Plant Systematic and Evolution*, trabalho intitulado: “Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Palicourea* (Rubiaceae)”. Na quarta seção, os extratos foliares de *Palicourea marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* foram testados para averiguar a ação sob a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, das leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e também sobre o fungo filamentosso *Fusarium solani*. Esses dados foram publicados na revista *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, trabalho intitulado “Bioatividade de extratos foliares de espécies de *Palicourea* (Rubiaceae) sobre *Trypanosoma cruzi*, *Candida sp* e *Fusarium solani*”. Na quinta seção, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos foliares das mesmas espécies testadas para atividade antifúngica e antiparasitária. Esses resultados estão sendo organizados e serão submetidos para publicação à revista *Biochemical Systematic and Ecology*. A sexta seção apresenta as conclusões dos resultados obtidos neste estudo.

## 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 A Mata Atlântica

A grande diversidade biológica, os altos níveis de riqueza e do endemismo, associados ao desflorestamento, incluíram a Mata Atlântica definitivamente no cenário mundial como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade (MITTERMEIER et al. 2004). Por esta razão, a integração entre várias áreas de estudo para o conhecimento desse bioma vem se destacando como de fundamental importância. Uma sugestão para a conservação dos fragmentos é que estes possam ser manejados a fim de manter mosaicos ligados funcionalmente; ou seja, fragmentos com conectividade estrutural (SCARANO; CEOTTO 2015).

A área original abrangia 1.1 milhões de km<sup>2</sup>, o equivalente a 12% do território brasileiro (MORELLATO 2000; OLIVEIRA-FILHO; FONTES 2000; GALINDO; CÂMARA 2005). Os números do quanto ainda resta da cobertura vegetal variam de acordo com a fonte e a metodologia utilizada (GALINDO; CÂMARA 2005; Fundação SOS Floresta Atlântica; INPE 2008). Murray-Smith (2009) acredita que este número gire em torno de 5%. De acordo com Ribeiro et al. (2009), restam 11% da vegetação original distribuída em fragmentos florestais de tamanho reduzido (<100 ha). Porém, de acordo com Guedes; Seehusen (2011), 22% da área original ainda estão cobertas com remanescentes de vegetação nativa.

Independente da metodologia utilizada, os remanescentes estão representados, em grande parte, por fragmentos em diferentes graus de degradação, devido a diferentes pressões antrópicas (OLIVEIRA-FILHO; FONTES 2000; FUNDAÇÃO SOS FLORESTA ATLÂNTICA; INPE 2001; ROCHA et al. 2003; CRUZ; SILVA-GONÇALVES; NUNES-FREITAS 2013). Segundo Metzger (2009), esses fragmentos são isolados por florestas de crescimento secundário em estágios iniciais e médios de sucessão.

Por ocupar uma grande extensão em área de latitude e longitude muito variada, com diferentes altitudes, relevos, tipos de solo e condições climáticas, esse bioma levou à formação de uma enorme variabilidade vegetacional através das diferentes regiões em que ocorre no país (MAYO; FEVEREIRO 1982; RODRIGUES et al. 1989; MANTOVANI, 1990; MORIM-DE-LIMA; GUEDES-BRUNI 1994; FELTILI et al. 2002; REZENDE et al. 2015). Por possuir essa grande diversidade florestal, ainda abriga espécies desconhecidas (LEWINSOHN; PRADO 2005), sobretudo do ponto de vista botânico (QUINET et al. 2000).

As formações desse bioma são: Florestas Ombrófila Densa e Ombrófila Mista (Floresta de Araucárias), Estacional Semi-decidual, Estacional Decidual e Savana (VELOSO

et al.1991). No Brasil, a Floresta Atlântica corresponde a segunda maior floresta tropical úmida, apenas sendo comparada à Floresta Amazônica. Este bioma estendia-se do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, e ocupava uma área de 1,3 milhões de quilômetros quadrados. Sua destruição se iniciou com a exploração do pau-brasil no século XVI. Hoje a maior parte da área litorânea, que era coberta pela Mata Atlântica, está ocupada por grandes cidades, pastos e agricultura (MORELLATO 2000; RIBEIRO et al. 2011; JOLY et al. 2014).

Trabalhos com diferentes abordagens a cerca dos remanescentes de Mata Atlântica vêm contribuindo para o conhecimento de sua diversidade vegetal. Por exemplo, estudos de abordagem geográfica como relatado no trabalho de Borgo (2011) com o objetivo subsidiar estudos de dinâmica da vegetação e efeitos das mudanças climáticas. Estudos de abordagem fitofisionômica vêm também contribuindo, como é o caso do trabalho de Brandão (2009) que avaliou a estrutura fitossociológica da comunidade arbórea em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa, em Igarassu – PE. Outra importante contribuição foi o trabalho de Delprete; Jardim (2012) que forneceu uma visão geral sobre a classificação de Rubiaceae com ênfase nos gêneros que ocorrem no Brasil.

No Estado do Rio de Janeiro a Floresta Atlântica ocupou 16% do território (CIDE 2000), a paisagem atual da região é constituída por fragmentos florestais geralmente pequenos, isolados, perturbados e circundados por extensas matrizes antrópicas, como pastos e monoculturas. O Estado do Espírito Santo apresenta também este processo de degradação com cerca de 9% da vegetação original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA 2002).

Os fragmentos florestais normalmente estão representados por unidades de conservação biológicas como é o caso do Parque Nacional do Itatiaia (PARNA Itatiaia), Parque Nacional da Serra dos órgãos (PARNASO) e Estação Biológica de Santa Lúcia (EBSL). O PARNA Itatiaia está localizado a sudoeste do estado do Rio de Janeiro (22°19' a 22°45' S e 44°45' a 44°50' W), com altitudes de 600 a 2791 metros sobre o mar (m.s.m), com temperaturas médias anuais, dependendo da elevação, sendo entre 15 e 27 °C (Disponível: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia/>, acessado: 23 de abril de 2016). Ocupa uma área de 30.000 hectares, o clima, pelos padrões de Köppen, é de dois tipos: Cwb (mesotérmico com verão brando e estação chuvosa no verão) nas partes elevadas da montanha, acima dos 1.600mde altitude, e Cpb (mesotérmico com verão brando sem estação seca) nas partes baixas das encostas da montanha (ALVARES et al. 2014). O relevo é montanhoso, incluindo encostas e o topo do planalto, onde emergem penhascos rochosos. A partir dos 1.600 m e até 2.200 m, as comunidades florestais têm seus tamanhos reduzidos. Acima dos 2.200 m, as comunidades passam a ser arbustivas, com pequenas manchas de vegetação arbórea. Na

região do planalto, a riqueza maior é das herbáceas. As variações de altitude permitem que sejam encontradas no Parque, além da típica Floresta Ombrófila Densa Montana, a Floresta alto montana, ou popularmente denominadas Florestas nebulares nas porções mais elevadas da Serra, a partir dos 1.600 m de altitude. À medida que se eleva a altitude a paisagem arbustivo-arbórea segue-se densa como cobertura campestre designada por campo de altitude (DOS SANTOS 2000).

O PARNASO está localizado no trecho da Serra do Mar na região central do estado do Rio de Janeiro, abrangendo os municípios de Teresópolis, Petrópolis e Guapimirim (22°52' a 22°54'S e 42°09' e 45°06'W), com altitudes de 200 a 2.263 m.s.m (Disponível: <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/atributos-naturais.html>, acessado: 08 de junho de 2015). Ocupa uma área de 20.024 hectares, o clima, segundo Köppen, é do tipo Cwb - tropical de altitude, com uma curta estação seca (ALVARES et al. 2014). O relevo é bastante acidentado com grande variação de altitude, podendo variar de 80 m a 2.263 m na Pedra do Sino, ponto culminante do Parque. As fisionomias vegetais do PARNASO variam de acordo com a altitude: até 1.500 m predominam as florestas pluvial baixo montana e montana, com espécies de grande porte, como o jequitibá; entre 1.500 e 2.000 m de altitude ocorre a floresta pluvial alto-montana, com vegetação de porte médio e árvores retorcidas exibindo um certo grau de xeromorfismo, devido às baixas temperaturas; e acima de 2.000 metros, ocorrem os campos de altitude, com porte herbáceo-arbustivo aberto, que se desenvolve sobre os afloramentos rochosos. (Em: < <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/atributos-naturais.html> > acesso em: 28 de maio de 2013).

A EBSL está localizada na região serrana do município de Santa Teresa, na Serra da Mantiqueira- Espírito Santo (19°57'10" a 19°59'00"S e 40°31'30" a 40°32'25"W), em altitudes de 550 a 950 msm. Ocupa uma área de 440 hectares, o clima é do tipo Cfa – subtropical úmido (KÖPPEN, 1948), sem estiagem, com temperatura do mês mais quente superior a 22° C e do mês mais frio entre 3 e 18° C (Disponível: [http://acd.ufrj.br/~araujo/ebsl/biologica\\_objetivo.htm](http://acd.ufrj.br/~araujo/ebsl/biologica_objetivo.htm), acessado: 8 de junho de 2015). Relevo com forte declividade, originando afloramentos rochosos de composição granito-gnaissica e pequenas várzeas intermontanas. A EBSL compreende um remanescente de Mata Atlântica ocupada por vegetação típica da Floresta Ombrófila Densa em diferentes estágios de sucessão. Grande parte da EBSL encontra-se em estágios avançados de sucessão vegetal, com fisionomia arbórea fechada e dossel atingindo entre 10 e 20 metros; alguns indivíduos emergentes ultrapassam os 30 metros de altura. Destacam-se neste ambiente representantes de

diversas espécies das famílias botânicas Myrtaceae, Lauraceae, Sapotaceae, Rubiaceae, Annonaceae, Melastoflorestaceae (MENDES; PADOVAN 2000).

Para que haja preservação destes fragmentos florestais, há necessidade de se conhecer melhor as famílias, gêneros e espécies de planta que estão presentes naturalmente nestas áreas.

## 1.2 A família Rubiaceae

Rubiaceae pertencente à ordem Gentinales (APG III 2009) e foi descrita primeiramente por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789. Esta família tem seu nome derivado de *Rubia* L., do latim *rubium*, referência à tinta vermelha produzida por algumas espécies deste gênero e utilizada para o tingimento de tecidos (CRONQUIST 1981). É considerada uma das maiores famílias de plantas lenhosas nos trópicos com espécies de importante valor econômico, histórico e com potencial terapêutico (GOEVARTS et al. 2007).

Rubiaceae apresenta uma distribuição cosmopolita, porém diversas espécies estão concentradas em florestas tropicais e subtropicais úmidas (ROBBRECHT 1988). De acordo com o banco de dados mundial, o número de espécies da família é de 13.548 e 617 gêneros (THE PLANT LIST 2010). No Brasil está representada por 1.347 espécies e 118 gêneros (FORZZA et al. 2010), estando esses distribuídos pelos biomas: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Restingas e Mata Atlântica (DELPRETE; JARDIM 2012), ocupando o quinto lugar em número de espécies (FORZZA et al. 2010).

A família é caracterizada por abrigar plantas arbóreas, arbustivas, subarbustivas, herbáceas; ervas eretas ou reptantes; trepadeiras volúveis herbáceas ou lenhosas; lianas terrestres ou raramente epífitas (Hillia). Caules cilíndricos, às vezes angulosos ou decussadamente achatados, geralmente inermes, ou com espinhos axilares (2 por nó em *Chomelia*, (2-)3-4 por nó em *Randia*). Ráfides presentes e abundantes em grande número de gêneros. Estípulas interpeciolares, sempre presentes, persistentes ou caducas, de formas muito variadas, inteiras, bífidas ou multifimbriadas, às vezes foliáceas e por vezes completamente semelhantes às mesmas folhas, dando a impressão de folhas verticiladas (*Galium*), ou concrecidas num cone apical imediatamente caduco (*Amaioua*). Folhas opostas e deussadas, menos frequentemente verticiladas, ou parecendo verticiladas pela presença de braquiblastos axilares (*Mitracarpus*, *Spermacoce*, *Staelia*) ou por ter estípulas semelhantes às folhas (*Galium*), ou excepcionalmente pseudoalternas. Lâminas simples, inteiras, raramente anisófilas com margem sempre inteira. A inflorescência pode ser paniculada, cimoso a racemosa, umbelada, espiga, capitada ou espiciforme, reduzidas a uma flor solitária, terminal

ou axilar. As flores são hermafroditas, as vezes unissexuais (por exemplo, *Cordia*, *Amaioua*, *Randia*, *Galium*), actinomorfas, raramente zigomorfas, frequentemente heteromorfas (distílicas), geralmente 4-5-meras (raramente 2-3-meras ou 6-7-meras). O cálice cupular ou tubular ou raramente extremadamente reduzido, comumente com pequenos lobos iguais ou desiguais, às vezes truncado ou ondulado, ou raramente com um ou mais lobos foliáceos ou petaloides. A corola é gamopétala, hipocrateriforme, infundibuliforme, campanulada ou tubulosa, raramente rotada; de prefloração valvar, contorta ou imbricada; frequentemente com pubescência no interior. Estames isostêmones e insertos no tubo da corola, alternados com os lobos da corola. Anteras livres, introrsas, com deiscência longitudinal, dorsi- ou basifixas. Ovário em regra ínfero, comumente bilocular, raramente plurilocular (raríssimo unilocular), com um até muitos óvulos em cada lóculo. Lóculos sincárpicos, com placenta central (muito raramente parietal, ex., *Randia*). Óvulos anátropos a semianátropos, apótropos, uni-tegumentados e tenuinucelados, algumas vezes com estrofiolo. Disco epígino, geralmente evidente, inteiro ou lobado. Estilete inteiro, bífido ou multífido (usualmente no mesmo número dos lóculos do ovário). Estigma capitado, oblongo ou com ramos estigmáticos no mesmo número dos lóculos. Fruto capsular (loculicídio e/ou septicídio), esquizocárpico, bacáceo ou drupáceo. Sementes uma, poucas ou muitas por cada lóculo (raramente uma por cada fruto, devido ao aborto de um óvulo, em *Coussarea*), livres, horizontais ou verticais, às vezes imersas em tecido placentário, lisas ou esculpidas, às vezes aladas, excepcionalmente com um penacho de pêlos (extensões do exotesta, em *Hillia*), endospermadas, com albúmem abundante, raramente escasso ou ausente. Embrião reto ou curvo (BARROSO et al. 1991; DELPRETE; SMITH; KLEIN 2004).

A divisão em subfamílias foi baseada ao longo do tempo, em diferentes características morfológicas. De Candolle (1930) e Schumann (1891) basearam-se no número de óvulos por lóculo do ovário. Verdcourt (1958) e Bremekamp (1966) na escassez ou abundância de endosperma e na presença ou ausência de ráfides. Já Robbrecht (1988) na placentação, biologia floral, morfologia e anatomia de frutos e sementes. As formas de classificação de Verdcourt (1958), Bremekamp (1966), e Robbrecht (1988) foram importantes fontes para estudos posteriores de taxonomia e morfologia (BREMER; MANEN 2000). Atualmente, a família está dividida em três subfamílias (*Rubioideae*, *Cinchonoideae* e *Ixoroideae*) sustentadas por estudos filogenéticos baseados em biologia molecular, com a nova posição e definição de suas tribos (BREMER 2009; BREMER; ERIKSSON 2009). Essa divisão é sustentada também por características anatômicas (DELPRET 2004) (Tabela 1).

Cinchonoideae Raf. é a menor subfamília, com aproximadamente 1.500 espécies. Em sua maioria são árvores pequenas ou arbustos, com prefloração imbricada ou valvar. Possui distribuição paleotropical, porém mais concentrada no continente americano, da América do Norte até a América do Sul (BREMER; ERIKSSON 2009). A subfamília Ixoroideae Raf. abriga árvores ou arbustos e a prefloração é variável, em sua maioria valvar ou imbricada para a esquerda, e muitos de seus representantes possuem apresentação secundária de pólen. A subfamília possui distribuição pantropical e pansubtropical com cerca de 4.000 espécies (BREMER; ERIKSSON 2009; BREMEKAMP 1966).

A subfamília Rubioideae Verdc. (VERDCOURT 1958) é um grupo monofilético bem definido, que pode ser caracterizado por ervas ou arbustos com ráfides de oxalato de cálcio, prefloração valvar e indumento com tricomas articulados (ROBBRECHT; MANEN 2006). A subfamília possui distribuição cosmopolita, tropical ou subtropical e é a maior dentro da família Rubiaceae, com 3.400 espécies e nove tribos (RAZAFIMANDIMBISON; RYDIN; BREMER 2008), incluindo as tribos: Palicoureae e Psychotrieae.

**Tabela 1** – Características gerais das três subfamílias atualmente reconhecidas na família Rubiaceae, com ênfase em gêneros neotropicais.

	<b>Cinchonoideae</b>	<b>Ixoroideae</b>	<b>Rubioideae</b>
<b>Hábito</b>	árvores, arbustos, lianas	árvores, arbustos, ervas, trepadeiras	geralmente ervas e arbustos, raramente árvores
<b>Estípulas</b>	inteira, raramente bífida (não fimbriada)	inteira, raramente bífida (não fimbriada)	inteira, bífida ou fimbriada ( <i>Spermacoceae</i> <i>lato sensu</i> )
<b>Calicofilos</b>	ausente (presente em <i>Kerianthera</i> )	presente em muitos gêneros (ou ausente)	ausente (presente em <i>Oreopolus</i> )
<b>Simetria foliar</b>	actinomorfa (zigomorfa em <i>Coutarea</i> e <i>Hillia</i> )	actinomorfa (zigomorfa em <i>Henriquezieae</i> e <i>Posoqueriae</i> )	actinomorfa (tubo da corola curvo em <i>Palicourea</i> )
<b>Estames inseridos</b>	na base, no meio do tubo ou perto da abertura da corola	no meio do tubo da corola ou perto da abertura	no meio do tubo ou perto da abertura da corola
<b>Ráfides de Oxalato de cálcio</b>	ausente (presente em <i>Hillia</i> e <i>Hamelia</i> )	ausente	presente

Fonte: DELPRETE 2004.

Metcalf; Chalk (1985) mencionam a importância do estudo anatômico como fonte de dados para a identificação e taxonomia das plantas, neste sentido, a anatomia sob o ponto de vista evolutivo fornece bases firmes para os estudos filogenéticos e ecológicos permitindo também uma melhor compreensão das adaptações das plantas ao ambiente em que se desenvolvem (DICKSON 1975; DESSEIN et al. 2001; MARTÍNEZ-CABRERA; TERRAZAS; OCHOTERENA 2009). O estudo da anatomia e / ou micromorfologia das folhas tem sido de grande importância taxonômica e tem se mostrado útil para a compreensão de adaptações ambientais (por exemplo, MANTOVANI et al. 1995; MORAES et al. 2011; MARQUES et al. 2015).

Estudos anatômicos, micromorfológicos unidos com os químicos e os de marcadores moleculares vêm se mostrando importantes na identificação de características capazes de separar *taxa*. Assim, esses estudos devem ser incentivados entre as Rubiaceae, uma vez que alguns gêneros como *Coussarea* Aubl., *Gardenia* Dumort, *Uncaria* Schreb., *Mitragyna*

Korth., *Psychotria* L., *Morinda* L., *Mitracarpus* Zucc., *Rudgea* Salisb., *Palicourea* Aubl., *Coutarea* Aubl. possuem espécies que apresentam potencial medicinal, podendo atuar como microbicidas, antiplasmódicos, analgésicos, anti-inflamatórios, antioxidantes e antitumorais (TOURE et al. 1996; GERMANO et al. 1999; AGUILAR et al. 2002; JAYASINGHE et al. 2002; SALUDES et al. 2002; DONGMO et al. 2003; SU et al. 2003; SUKSAMRARN; TANACHATCHAIRATANA; KANOKMEDHAKUL 2003; ALVES et al. 2004; BENEVIDES et al. 2004; GATTUSO et al. 2004; JANGDE; BANSOD 2004; HAMERSKI et al. 2005; HEITZMAN et al. 2005; KIM et al. 2005).

Estudos taxonômicos da família ligados a anatomia e a composição química têm indicado sua importância. Aguiar (2005) caracterizou sete espécies de *Coffea* com a utilização de variáveis relacionadas à composição química e indicou a possibilidade de duas variedades serem híbridas entre duas das espécies caracterizadas. Moraes e colaboradores (2009) caracterizaram a anatomia e a ultraestrutura da lâmina foliar de seis espécies de *Simira* e observaram que a presença de alcaloides pode ter valor taxonômico para o gênero. Bremer e Manen (2006) definem Palicoureeae sem estípulas decíduas; de germinação pré-formada em sua maioria presentes; ausência do pigmento vermelho no revestimento da semente. Isso é diferente em Psychotrieae que tem estípulas caducas; fendas de germinação pré-formada em sua maioria ausentes (exceto nos representantes do Pacífico); e revestimento do pigmento vermelho nas sementes presentes na maior parte.

Ademais, segundo Taylor; Lorence; Gereau 2010, pesquisas morfológicas e moleculares indicam que *Palicourea* e muitas espécies de *Psychotria*, do subgênero Heteropsychotria, compreendem um único grupo evolutivo. Em seu trabalho, Taylor e colaboradores transferiram 25 espécies de *Psychotria* para *Palicourea*, sendo a classificação infragenérica baseada principalmente em características como estípula, fruto e tipo de venação foliar. Apesar dos numerosos estudos moleculares que foram empreendidos para a família (por exemplo: ANDERSSON; ROVA 1999; NEPOKROEFF; BREMER; SYTSMA 1999; BREMER; MANEN 2000; ROBBRECHT; MANEN 2006; BREMER; ERIKSSON 2009; BARRABÉ et al. 2014; RAZAFIMANDIMBISON et al. 2014), algumas dúvidas taxonômicas permanecem em determinados *taxa*.

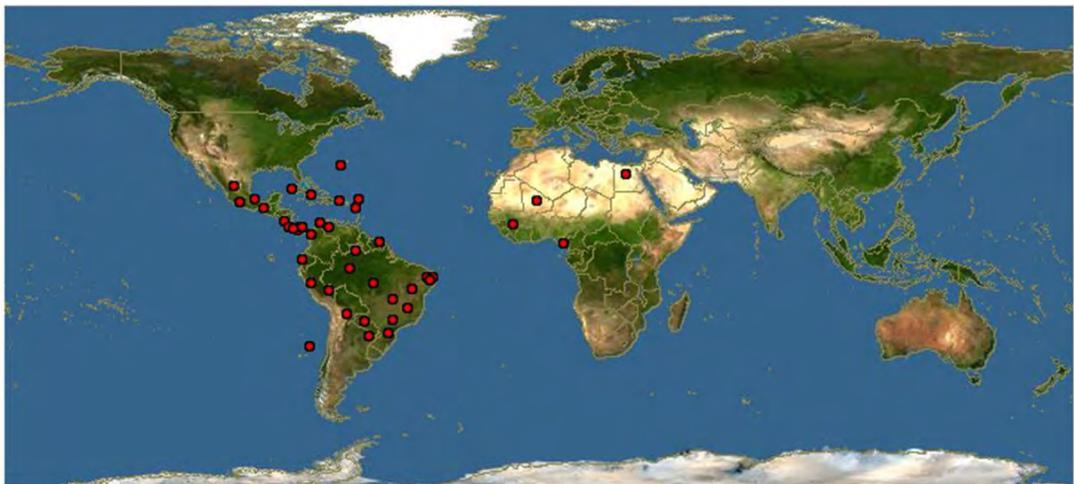
A tribo Palicoureeae necessita, por exemplo, de estudos sobre os limites e as relações inter e infragenéricas. A circunscrição atual de Palicoureeae inclui oito gêneros amplamente aceitos: *Carapichea*, *Chassalia*, *Geophila*, *Hymenocoleus*, *Margaritopsis*, *Notopleura*, *Palicourea* e *Rudgea* (por exemplo, ROBBRECHT; MANEN 2006; GRUBER et al. 2008; KOEHBACH et al. 2013; TAYLOR; GERAU 2013). No entanto, Razafimandimbison e

colaboradores (2014) demonstraram que o monofiletismo e as delimitações desses gêneros precisam ser rigorosamente testados com uma filogenia da tribo com base em uma amostra ampliada de dados.

### 1.3 Gênero *Palicourea*

*Palicourea* Aublet é um gênero neotropical, subordinado à subfamília Rubioideae, supertribo Psychotriidinae, tribo Palicoureeae (ROBBRECHT; MANEN 2006). O gênero aumentou de 290 (EL SEEDII 1999) para 800 espécies, incluindo espécies do gênero *Cephaelis* e do subgênero *Heteropsychotria* (TAYLOR; LORENCE; GEREAU 2010). Possui centros de riqueza na América do Sul e na América Central em países como: México, Equador, Colômbia, Paraguai e Brasil (TAYLOR; GARDEN; TAYLOR 1997), (Figura 1). O planalto do Sul-Centro do Brasil é um dos centros de diversidade do gênero na América do Sul (COELHO; BARBOSA 2003), podendo ocorrer também no cerrado, onde as espécies são, de modo geral, endêmicas (TAYLOR 1993). No Brasil ocorrem 56 espécies e seis subespécies de *Palicourea*, sendo 16 espécies e duas subespécies citadas para Mata Atlântica (Rubiaceae no Brasileiro 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro Disponível: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14133>, acessado: 23 de abril de 2016).

**Figura 1** - Distribuição geográfica do gênero *Palicourea*.



Legenda: fonte: (Adaptado <http://www.discoverlife.org/>).

Este gênero apresenta plantas arbustivas ou arbóreas de pequeno e grande porte, de folhas inteiras, simples, opostas ou verticiladas. As estípulas são unidas ao redor do caule formando uma bainha, caduca ou persistente. De acordo com Taylor e colaboradores (2010), *Palicourea* inclui plantas adaptadas para a polinização por beija-flor, com flores inodoras,

pediceladas; inflorescência e flores são coloridas; corola tubulares relativamente grandes com tubos bem desenvolvidos, muitas vezes curvados e expandidos na base, com esta porção basal contendo néctar que são protegidos de insetos por um denso anel de tricomas; são hermafroditas, geralmente distílicas, uma condição considerada ancestral no gênero (TAYLOR; GARDEN; TAYLOR 1997); os frutos são carnosos variando de azuis a nigrescentes e dispersos por aves (TAYLOR et al. 2007).

#### **1.4 Potencial Biológico e Químico do Gênero *Palicourea***

*Palicourea* apresenta espécies com potencial ornamental e fitotoxicológico e várias espécies são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, tosse e dores de estômago, além de estarem incluídas na lista de plantas utilizadas contra o câncer (HARTWELL 1971). Os principais trabalhos realizados com o gênero no Brasil têm abordado aspectos ecológicos das populações, a biologia reprodutiva ou a morfoanatomia foliar das espécies (PEREIRA; MEIRA; AZEVEDO 2003; OLIVEIRA et al. 2004; BARBOSA-FILHO et al. 2007; MENDONÇA; DOS ANJOS 2006; SANTOS et al. 2008; BARBOSA et al. 2010; MACHADO et al. 2010).

A utilização das folhas de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum., popularmente conhecida como "douradinha", em preparações de remédios caseiros na forma de chás, é prática comum tanto por comunidades rurais como por populações urbanas, oriundas principalmente de regiões do cerrado. Suas principais indicações terapêuticas são para inflamação de uretra e rins e como diurético. Relatos sobre a sua eficácia são encontrados em cartilhas populares que resgatam formas tradicionais de tratamentos de doenças (VENCATO et al. 2004). *Palicourea rigida* (Kunth) é utilizada como ornamental, devido a características como a arquitetura de seu caule, ramos, folhas e também a presença marcante de suas flores. É uma planta bastante conhecida na medicina popular, sendo o decocto de suas folhas e hastes utilizado em doenças do sistema urinário como a cistite (PIO CORRÊA 1984). Folhas e raízes são usadas como anti-sifílico, folhas e casca do caule como depurativo e para inflamações do ovário (GRANDI et al. 1989).

A investigação química deste gênero descreve a presença de cumarinas, ácidos benzóicos e terpenos (EL SEEDII 1999), além de alcaloides (DO NASCIMENTO et al. 2006), alcaloides indólicos e quinolínicos (VALVERDE; TAMAYO; HESSE 1999). De acordo com a literatura, um número significativo de espécies apresenta potencial citotóxico de seus extratos e frações (CRAGG et al. 2006).

As pesquisas atuais têm provado que os produtos naturais são uma fonte rica de fitoterápicos frente a uma grande variedade de doenças e distúrbios humanos, os avanços na separação e purificação de substâncias têm contribuído para isso (VEIGA-SANTOS et al. 2013). Além disso, muitos compostos, derivados de plantas, apresentaram atividade em concentrações micromolares (MAYA et al. 2007; IZUMI et al. 2010; VEIGA-SANTOS et al. 2010). Entre estes estão alguns compostos isolados de espécies de *Palicourea* (VALVERDE; TAMAYO; HESSE 1999; LEE et al. 2012; COOK et al. 2014; BERGER et al. 2015). Por exemplo, *Palicourea coriaceae*, um arbusto pequeno com inflorescência e flores amarelas, coletada no Mato Grosso do Sul, na qual foi isolada de folhas o alcaloide calicantina considerado um poderoso convulsivo (DA SILVA; DE CARVALHO; ALVES 2008). Além disso, Do Nascimento e colaboradores (2008) isolaram de raízes desta mesma espécie o alcaloide  $\beta$ -carbolina, o qual, em trabalho prévio, já havia apresentado atividade contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* (RIVAS et al. 1999).

Algumas espécies possuem importância toxicológica e econômica como é o caso da espécie *Palicourea marcgravii* (A. St.-Hil.) conhecida como erva-do-diabo ou erva-de-rato (TOKARNIA 1979). A toxicidade de *P. marcgravii* é dada principalmente pela presença do fluorocitrato e metabólito dos fluoracetatos. E este composto inibe duas importantes enzimas do ciclo de Krebs: a aconitase, que catalisa o metabolismo do citrato, e a succinato desidrogenase, que catalisa o metabolismo succinato. As inibições dessas duas enzimas e as subsequentes formações do bloqueio do ciclo de Krebs levam a uma diminuição do metabolismo da glicose, do armazenamento de energia e da respiração celular. Diante deste fato *P. marcgravii* vem sendo utilizada como recurso natural alternativo para o controle de pragas na agricultura (GONZAGA et al. 2008).

Dentre as dezesseis espécies de *Palicourea* referidas para Mata Atlântica no Brasil estão *P. marcgravii*, a mais citada na literatura devido ao seu considerável potencial tóxico, *P. guianensis* (Fig. 2a), *P. rudgeoides* (Fig. 2b), *P. tetraphylla* (Fig. 2c), *P. fulgens* e *P. longipedunculada* selecionadas neste estudo.

**Figura 2** - Imagens de espécies do gênero *Palicourea*.



*P. fulgens*



*P. guianensis*



*P. longipedunculata*



*P. marcgravii*



*P. rudgeoides*



*P. tetraphylla*

Legenda: Fonte - Msc Carla Y' Gubaú Manão, 2012

Levando em consideração a dificuldade de encontrar caracteres que auxiliem nos estudos taxonômicos em função da necessidade de melhor delimitar suas espécies, principalmente, quando desprovidas de material reprodutivo e também o grande potencial fitotóxicológico já identificado para algumas das espécies desse gênero, o presente trabalho utilizou a anatomia, micromorfologia e fitoquímica da folha, assim como testou a ação de extratos foliares para responder as seguintes questões: (1) as características anatômicas e micromorfológicas possuem valor diagnóstico para a segregação das espécies estudadas do gênero *Palicourea*? (2) os constituintes químicos das espécies estudadas podem auxiliar nesta

diagnose? (3) considerando a importância econômica e os efeitos farmacológicos, estas espécies apresentam potencial farmacológico?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Caracterizar de forma comparativa a anatomia, ultraestrutura, micromorfologia e fitoquímica foliar, bem como avaliar a atividade antifúngica e antiparasitária, de seis espécies do gênero *Palicourea* da Mata Atlântica na região sudeste do Brasil.

### 2.2 Específicos

- ✓ Estabelecer um estudo descritivo da anatomia e da micromorfologia foliar de *Palicourea fulgens* (Müll. Arg.) Standl., *P. guianenses* Aubl., *P. longipedunculata* Gardner, *P. marcgravii* A. St.-Hil., *P. rudgeoides* (Müll. Arg.) Standl e *P. tetraphylla* Cham. & Schltdl.;
- ✓ Avaliar as características anatômicas dessas seis espécies que possam estar relacionadas ao ambiente;
- ✓ Realizar análises estatísticas e ordenar as seis espécies através dos caracteres anatômicos qualitativos;
- ✓ Realizar estudos fitoquímicos e histoquímicos de *Palicourea marcgravii*, *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides*;
- ✓ Identificar as classes químicas predominantes nessas três espécies e o perfil químico do gênero;
- ✓ Calcular parâmetros quimiosistemáticos;
- ✓ Verificar a atividade antifúngica e antiparasitária dos extratos foliares de *Palicourea marcgravii*, *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides*.

### 3 MORFOANATOMIA E ULTRAESTRUTURA FOLIAR

#### 3.1 Introdução

Rubiaceae é a maior família de plantas lenhosas nos trópicos e tem espécies de grande valor histórico, econômico, ornamental e medicinal (GOEVARTS; FRODIN; RUHSAM 2007). A classificação atual divide a família em duas subfamílias: Cinchonoideae e Rubioideae (ROBBRECHT; MANEN 2006). No entanto, estudos filogenéticos baseados em biologia molecular têm mantido a sua divisão em três subfamílias Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae, porém com a nova posição e definição de suas tribos (BREMER 2009; BREMER; ERIKSSON 2009).

Apesar dos numerosos estudos moleculares que foram realizados para a família (por exemplo: ANDERSSON; ROVA 1999; NEPOKROEFF; BREMER; SYTSMA 1999; BREMER; MANEN 2000; ROBBRECHT; MANEN 2006; BREMER; ERIKSSON 2009; BARRABÉ et al. 2014; RAZAFIMANDIMBISON et al. 2014), e de já existirem marcadores químicos indicando uma tendência para cada subfamília, algumas dúvidas taxonômicas permanecem em determinados táxons. Dentre as nove tribos existentes na subfamília Rubioideae estão a tribo Psychotrieae e Palicoureeae, dentre as quais, ainda existem dúvidas com relação a classificação de espécies. A tribo Palicoureeae necessita, por exemplo, de estudos sobre os limites e as relações intra e infragenéricas. A circunscrição atual de Palicoureeae sensu (ROBBRECHT; MANEN 2006) inclui oito gêneros amplamente aceitos: *Carapichea*, *Chassalia*, *Geophila*, *Hymenocoleus*, *Margaritopsis*, *Notopleura*, *Palicourea* e *Rudgea* (GRUBER et al. 2008; KOEHBACH et al. 2013; TAYLOR; GEREAU 2013). No entanto, Razafimandimbison e colaboradores (2014) demonstraram claramente que o monofiletismo e as delimitações desses gêneros precisam ser rigorosamente testados com uma filogenia robusta da tribo com base em uma amostra ampliada de dados.

O estudo da anatomia e/ou micromorfologia das folhas tem sido de grande importância taxonômica e assim como se mostrado útil para a compreensão de adaptações ambientais (por exemplo, BREDENKAMP; VAN WYK 2001; PELEGRIN; LONGHI-WAGNER; OLIVEIRA 2009; CARDOSO; PROENA; SAJO 2009). Tais estudos têm sido amplamente realizados dentro da família Rubiaceae, e na Mata Atlântica sua aplicação pode ser constatada entre os gêneros: *Coussarea* Aubl. (TAVARES; VIEIRA 1994), *Posoqueria* Aubl. (ARRUDA; GOMES 2010), *Psychotria* L. (MORAES et al. 2011), *Rondeletia* L. (KOCISIS et al. 2004), *Rudgea* Salisb. (MANTOVANI et al. 1995), *Rustia* Klotzsch (VIEIRA et al. 2001), *Simira* Aubl. (MORAES et al. 2009), e *Uncaria* Schreb. (GATTUSO et al. 2004). As

características anatômicas das folhas podem revelar estruturas que são importantes para compreender de maneira funcional e adaptativa a capacidade da planta para prosperar em ambientes específicos (SCAFARO et al. 2011; TOMÁS et al. 2013), assim como revelar estruturas resultantes do genoma modificado pela ação do ambiente e servirem como auxílio em estudos taxonômicos, fornecendo bases firmes para os estudos filogenéticos e ecológicos (METCALFE; CHALK 1985; DICKISON 1975). A folha por ser o órgão primário de síntese, apresenta maior plasticidade e o que mais responde, estruturalmente, às variações impostas pelo meio (KLINGENBERG et al. 2012).

De acordo com Taylor e colaboradores (2010), *Palicourea* s.s. inclui plantas adaptadas para a polinização por beija-flor, com flores inodoras, pedicelatas; inflorescência e flores são coloridas; e as corolas são relativamente grande, com tubos bem desenvolvidos, muitas vezes curvos que são expandidos na base, com a porção basal contendo néctar, que é protegido dos insetos por um anel firme de tricomas.

Neste estudo, a estrutura da folha e a micromorfologia de seis espécies de *Palicourea* da Mata Atlântica é descrita e discutida em relação aos aspectos taxonômicos e ecológicos, com objetivo de expandir a base de dados relativa ao gênero.

### 3.2 Material e Métodos

#### Material botânico

Folhas completamente expandidas de seis espécies foram amostradas: *Palicourea fulgens*; *P. guianenes*; *P. longipedunculata*; *P. marcgravii*; *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla*. O número de indivíduos estudados por espécie e os sítios de coleta são apresentados na tabela 2. *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* foram coletadas por duas vezes em diferentes anos, 2011 e 2013. As espécies coletadas no Parque Nacional do Itatiaia foram encontradas na borda das trilhas, *P. marcgravii*, *P. longipedunculata* e *P. rudgeoides* estavam pouco expostas ao sol sendo encobertas por arbustos mais altos ao redor. Já *P. tetraphylla* estava completamente exposta ao sol. As espécies coletadas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos são plantas de sub-bosque com pouca exposição luminosa encobertas por árvores, mas não totalmente sombreadas, porque essas estavam próximas a trilha. *P. marcgravii*, coletada no Espírito Santo, também se encontra na borda da trilha com exposição solar mediana, mesmo próximo à trilha havia muitas plantas ao redor. *P. guianenses* foram encontradas dentro da mata e próxima ao rio com leve exposição solar. *P. fulgens* foram coletadas em áreas bem sombreadas e sempre próximas ao leito do rio, em ambientes mais úmidos.

**Tabela 2** - Espécies estudadas, abreviações, número de registro no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ) e no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (HUENF) e sítio de coleta com as respectivas altitudes e coordenada geográfica do ponto de amostragem.

<b>Espécies</b>	<b>Abreviações</b>	<b>Número de registro</b>	<b>Sítio de coleta</b>	<b>Altitude</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>
<i>P. fulgens</i> (Müll. Arg.) Standl.	fulg	HRJ-12443	Estação Ecológica de Santa Lúcia-ES	640 m	40° 31' 49.3"
<i>P. guianensis</i> Aubl.	guia	HRJ-12441	Estação Ecológica de Santa Lúcia-ES	605 m	40° 32' 30.3"
<i>P. longipedunculata</i> Gardner	long_Ita	HUENF-5970	Parque Nacional do Itatiaia-RJ	753 m	41° 30' 58.3"
<i>P. longipedunculata</i> Gardner	long_Ter	HRJ-12447	Teresópolis-RJ (estrada da posse*)	963 m	43° 00' 28.6"
<i>P. longipedunculata</i> Gardner	long_Pet	HRJ-12448	Parque Nacional da Serra dos Órgãos-RJ	1153 m	43° 05' 32.7"
<i>P. marcgravii</i> A. St.-Hil.	marc_Ita	HRJ-12442	Parque Nacional do Itatiaia-RJ	662 m	40° 31' 79.8"
<i>P. marcgravii</i> A. St.-Hil.	marc_ES	HRJ-12446	Estação Ecológica de Santa Lúcia-ES	654 m	44° 36' 28.9"
<i>P. rudgeoides</i> (Müll. Arg.) Standl	rud	HRJ-12444	Parque Nacional do Itatiaia-RJ	815 m	22° 25' 63.5"
<i>P. tetraphylla</i> Cham. & Schldl.	tetr	HRJ-12445	Parque Nacional do Itatiaia-RJ	628 m	44° 36' 61.3"

Legenda: \*Estrada da Posse- estrada que vai para a Fazenda da Posse no bairro de Campo Grande

### **Fixação e desidratação do material**

Fragmentos de folhas, do 3º e/ou 4º nós, completamente expandidas foram fixados por duas horas à temperatura ambiente em uma solução fixadora de KARNOVSKY (1965), adaptada por Da Cunha e colaboradores (2000) contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por uma hora em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após lavagem no mesmo tampão seguiu-se uma série de desidratação cetônica: 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100 %.

### **Infiltração e inclusão do material**

A infiltração substituiu gradualmente a acetona do material botânico pela resina epoxi. As amostras em epoxi puro foram colocadas em formas e levadas a estufa a 70 °C por 48 h (GARTNER; HIATT 1999).

Na infiltração em historesina (Historesin Embedding Kit) fragmentos das folhas foram fixados e lavados como no item 3.3 e após estas etapas seguiu-se uma série de desidratação alcoólica: 50 %, 70 %, 90 %, 100 %. A infiltração substituiu gradualmente o álcool pela solução de infiltração da resina (Leica Historesin®). A inclusão foi feita com solução de embebedimento da resina Leica Historesin® em cápsulas de gelatina.

### **Microscopia óptica**

Em micrótomato rotatório (Cut 4050 Slee Mainz) foram obtidas seções de 4 µm de espessura, para o material emblocado em historesina. Em ultramicrótomato (Reichert ultracuts), foram obtidas as seções semifinas de 0,70 µm de espessura, para o material emblocado em resina epoxi. As seções foram coradas com azul de toluidina, montadas em lâminas permanentes com Entelan® e observadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS), usando uma câmera digital Hamamatsu C3077 ou uma câmera Canon Powershot A640 e o software Analysis® - LINK / ISIS / ZEISS (Oxford, Reino Unido).

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Após a desidratação, as amostras foram secas em Ponto Crítico usando CO<sub>2</sub> (CPD 030 Bal-tec). Os fragmentos foram afixados com cola de carbono em suporte próprios (stubs), cobertos com uma fina camada de ouro (20 nm) no aparelho SCD 050 Bal-Tec e observados no Microscópio Eletrônico de Varredura (DSEM 962 ZEISS). A presença de cera epicuticular

foi verificada por meio de lavagem das folhas em clorofórmio, durante um minuto e comparando-os com amostras não tratadas (MORAES et al. 2009).

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As seções ultrafinas (70 a 90 nm de espessura) foram feitas em ultramicrotomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments®) e coletadas em grades de cobre de 300 mesh. Em seguida, as seções foram contrastadas com acetato de uranila 5 %, por 20 minutos, e citrato de chumbo, por 5 minutos em temperatura ambiente (REYNOLDS 1963), e posteriormente, observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET 900 ZEISS) com uma aceleração de voltagem de 80 kV. A organização da parede celular externa periclinal foi classificada de acordo com Moraes e colaboradores (2009).

### **Testes histoquímicos**

Cortes finos foram obtidos à mão livre do material botânico recém-coletado e cortes do material fixado que foram submetidos a diferentes técnicas de coloração (Tabela 3). Os cristais foram testados por insolubilidade em ácido acético e solubilidade em ácido clorídrico (MCLEAN; COOK 1958), e examinadas em Microscópio Óptico Axioplan ZEISS.

**Tabela 3** - Corantes usados nos testes histoquímicos.

<b>Reagentes</b>	<b>Metabólitos Vegetais</b>	<b>Autor (s)</b>
Safrablau	Celulose e lignina	adaptado de Luque et al. 1972
Sudan III e Sudan IV	Lípídeo	Sass 1951 e Gerlach 1984
Lugol	Amido	Berlyn; Miksche 1976
Vermelho de Rutênio	Pectina	Johansen 1940
Floroglucina	Lignina	teste de Wisner- Adler et al. 1948
Dicromato de potássio	Fenóis	Gabe 1968
Cloreto Férrico	Composto fenólico	Johansen 1940
Dragendorff	Alcaloide	Svensen; Verpoorte 1983
EDTA + ácido rubiânico	Ácidos graxos	Ganter; Jolles 1970
Reagente de Nadi	Terpenoides (óleos essenciais e oleoresinas)	David; Carde 1964
Reagente de Schiff	Polissacarídios gerais	McManus 1948
Azul de comassie	Proteína	Fischer 1968
Azul de Toluidina	Compostos ácidos e básicos	O'Brien et al. 1964

Legenda: testes histoquímicos usados para detectar metabólitos na lâmina foliar.

Para analisar a epiderme em vista frontal foi feita a dissociação de acordo com Macedo e colaboradores (2005). Fragmentos de folhas foram fervidos em ácido nítrico 10% por 20 minutos na capela. Após a dissociação das epidermes, as mesmas foram lavadas em água destilada, coradas com safranina 1%, por um minuto à temperatura ambiente (SASS 1951). As lâminas foram seladas em glicerina 50%. As imagens foram obtidas através de uma câmera (Cannon Power Shot A640) acoplada ao Microscópio Óptico de campo claro (Axioplan Zeiss).

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0 (STATSOFT 2004) e PAST (HAMMER et al. 2001). A presença ou ausência de quarenta e um caracteres morfológicos e anatômicos foram avaliadas para nove indivíduos do gênero

*Palicourea*. Trinta e dois desses caracteres (Tabela 4) foram selecionados, a partir dos quais, foi montada uma matriz binária simétrica para análise de componentes principais (PCA), usada para ordenar as espécies e os caracteres anatômicos qualitativos (LUDWIG; REYNOLDS 1988) e análise de agrupamento com base em UPGMA, para verificação de grupos distintos (SNEATH; SOKAL 1973).

### 3.3 Resultados

As seis espécies de *Palicourea* estudadas apresentam: lâmina foliar hipostomática, com estômatos paracíticos (rubioide); epiderme unisseriada, com tricomas tectores unisseriados; mesofilo dorsiventral; feixes vasculares cercados por uma camada única de bainha parenquimática sem extensões; região intercostal biconvexa; sistema vascular em forma de U; córtex do pecíolo composto por colênquima angular e / ou anelar, parênquima fundamental nas camadas internas e as fibras perivasculares em torno de todo o tecido vascular. Numerosos micro-organismos, tais como fungos e bactérias, foram observados na superfície da epiderme.

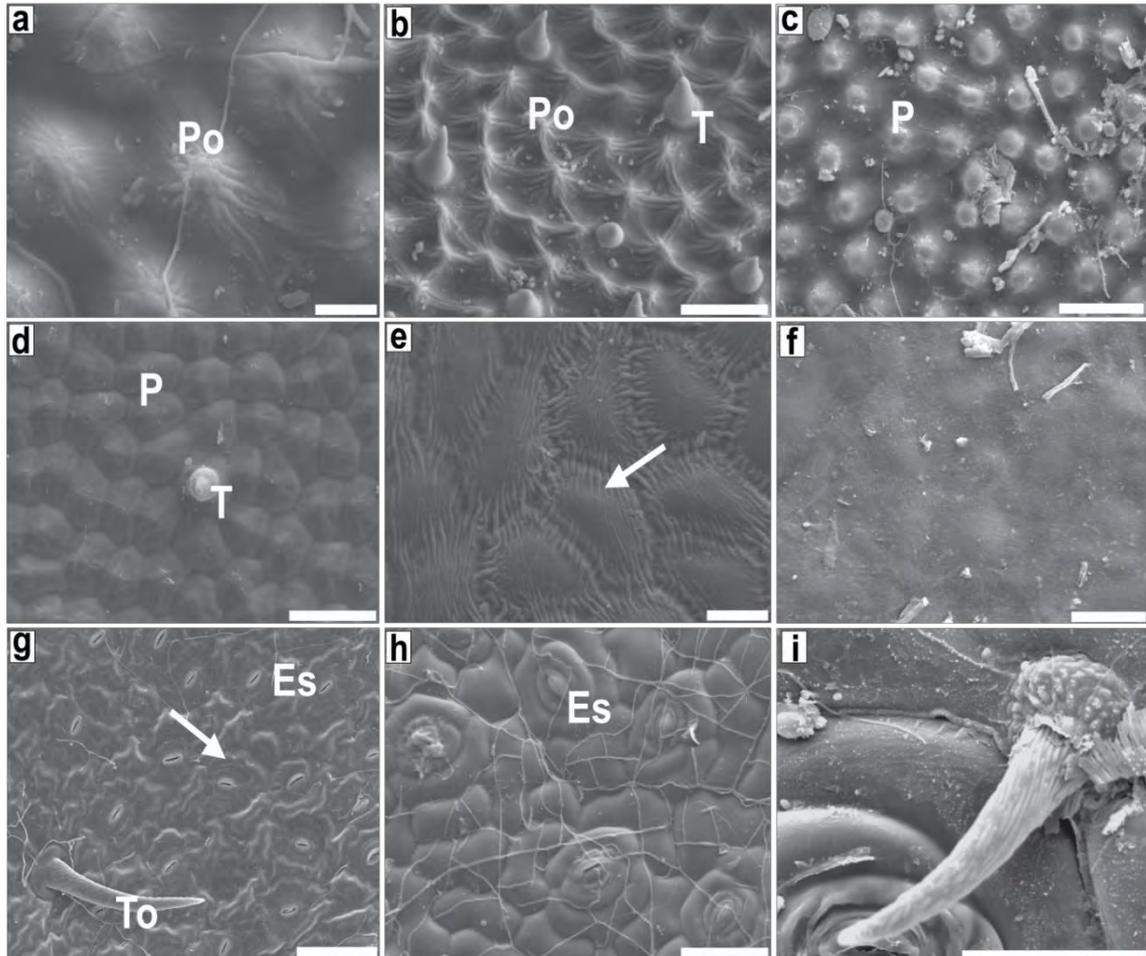
#### Micromorfologia foliar

As folhas das espécies estudadas apresentam epiderme coberta por uma camada lisa de cera epicuticular (Figs. 3a-i). Em seis dos oito indivíduos analisados, a superfície foliar apresentou face adaxial papilosa (fig. 3a, b, c, d). As exceções foram *P. fulgens* (Fig. 3e) e *P. marcgravii* (*P. marc\_Ita*) (Fig. 3f). Papilas ornamentadas foram encontradas na superfície adaxial, *P. tetraphylla*, *P. longipedunculata* (*P. long\_Pet* e *P. long\_Ter*) e *P. guianensis* (Fig. 3b), enquanto que *P. marcgravii* (*P. marc\_ES*) e *P. rudgeoides* (Fig. 1d) mostraram papilas sem ornamentação (Tabela 4).

Ornamentações cuticulares foram observadas na superfície adaxial da epiderme de *P. fulgens* (Fig. 3e) e, em menor grau, em *P. longipedunculata* (*P. long\_Ita*). Na superfície abaxial da epiderme, foram identificadas ornamentações nas células subsidiárias dos estômatos como observado em *P. rudgeoides* (Fig. 3g). Tricomas tectores foram observados em todas as espécies (Fig. 3 b, d, g e i), mas ocorrem apenas na superfície adaxial de *P. guianensis* (Fig. 3b) e *P. longipedunculata* (*P. long\_Pet*) e apenas na superfície abaxial de *P. fulgens* e *P. longipedunculata* (*P. long\_Ita*) (Tabela 4). Tricomas ornamentados foram observados em *P. tetraphylla* (Fig. 3i), *P. rudgeoides*, *P. marcgravii* e *P. fulgens* (Tabela 4). Nas espécies estudadas, foi observada uma enorme quantidade de micro-organismos nas

superfícies foliares, como hifas claramente identificadas em *P. fulgens* (Fig. 3h). Os estômatos são do tipo paracítico e distribuídos somente na face abaxial (fig. 3g, h, i).

**Figura 3** - Microscopia Eletrônica de Varredura de espécies de *Palicourea*.



Legenda: Superfície adaxial e abaxial da lâmina foliar de espécies de *Palicourea*. **a**: superfície adaxial de *P. longipedunculata* (coletada em Petrópolis). **b**: superfície adaxial de *P. guianensis*. **c**: superfície adaxial de *P. marcgravii* (coletada no Espírito Santo). **d**: superfície adaxial de *P. rudgeoides*. **e**: superfície adaxial de *P. fulgens*. **f**: superfície adaxial de *P. marcgravii* (Itatiaia). **g**: superfície abaxial de *P. rudgeoides*. **h**: superfície abaxial de *P. fulgens*. **i**: superfície abaxial de *P. tetraphylla*. Papila ornamentada (Po), tricoma (T), papila (P), ornamentação cuticular (seta), estômato (Es). Barras: a, e e f = 20  $\mu\text{m}$ ; b, c e i = 50  $\mu\text{m}$ ; d, g e h = 100  $\mu\text{m}$ .



	<i>P. fulg</i>	<i>P. guia</i>	<i>P. long_ Ita</i>	<i>P.long_ Ter</i>	<i>P.long_ Pet</i>	<i>P.marc_ Ita</i>	<i>P.marc_ ES</i>	<i>P.rud 1</i>	<i>P.rud 2</i>	<i>P.tetr 1</i>	<i>P.tetr 2</i>
<b>Anatomia da região intercostal</b>											
14- Contorno biconvexo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15- Contorno plano-convexo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16- Tricomas tectores	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
17- Colênquima angular	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
18- Colênquima anelar	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
19- Feixes de ráfides	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
20- Cristais prismáticos	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
21- Sistema vascular em arco com extremidades curvas	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
22- Sistema vascular em arco, sem extremidades curvas	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
23- Sistema vascular em forma de U	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>Anatomia do pecíolo</b>											
24- Contorno biconvexo	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
25- Contorno circular	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
26- Contorno plano-convexo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
27- Feixes de ráfide	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
28- Cristais prismáticos	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+

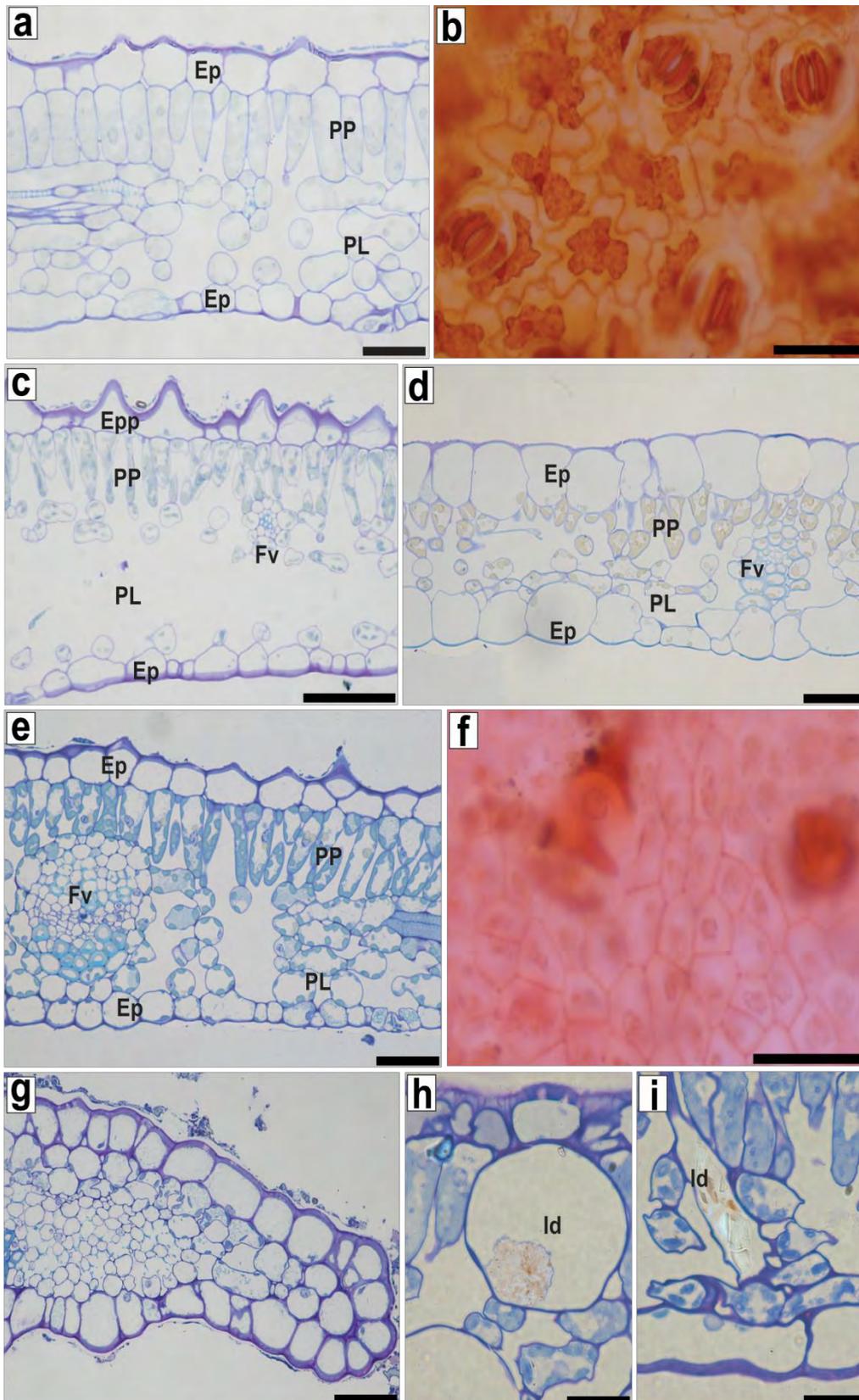
Anatomia do pecíolo	<i>P. fulg</i>	<i>P. guia</i>	<i>P. long_</i>	<i>P. long_</i>	<i>P. long_</i>	<i>P. marc_</i>	<i>P. marc_</i>	<i>P. rud</i>	<i>P. rud</i>	<i>P. tetr</i>	<i>P. tetr</i>
			Ita	Ter	Pet	Ita	ES	1	2	1	2
29- Sistema vascular em arco, sem extremidades curvas	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
30- Sistema vascular em U	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
31- Presença de tricomas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
32- Presença de papilas	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Legenda: *P.fulg* (*P. fulgens*), *P.guia* (*P. guianensis*), *P. long\_Ita* (*P. longipedunculata* coletada em Itatiaia), *P.long\_Ter* (*P. longipedunculata* coletada em Teresópolis), *P.long\_Pet* (*P. longipedunculata* coletada em Petrópolis), *P.marc\_Ita* (*P. marcgravii* coletada em Itatiaia), *P.marc\_ES* (*P. marcgravii* coletada no Espírito Santo), *P.rud 1* (*P. rudgeoides* coletada em Itatiaia em 2013), *P.rud 2* (*P. rudgeoides* coletada em Itatiaia em 2011), *P.tetr 1* (*P. tetraphylla* em Itatiaia em 2013), *P.tetr 2* (*P. tetraphylla* em Itatiaia em 2011). Símbolos: (+) presença; (-) ausência. Quadrados indicam características exclusivas de determinadas espécies.

### **Anatomia da lâmina foliar**

Seções transversais, da região intercostal da lâmina foliar, mostram que todas as espécies têm: mesofilo dorsiventral, epiderme unisseriada coberta por uma cutícula delgada (Figs 4a, c, d e e) e feixes vasculares sem extensão de bainha (Figs. 4c, d e e). Além disso, em todas as espécies, a dissociação epidérmica revelou a presença de células epidérmica com paredes anticlinais sinuosas na superfície abaxial da folha (Fig. 4b) e superfície adaxial com paredes de retas a levemente sinuosas (Fig. 4f) (Tabela 4); estômatos paracíticos e paralelocítico restritos a superfície abaxial e ao mesmo nível das demais células epidérmicas. As paredes periclinais externas das células epidérmicas são ligeiramente convexas, exceto as que apresentam papila. O parênquima paliçádico é composto por uma (Fig. 4a) a duas camadas (Figs. 4c, d e e) de células alongadas geralmente orientadas perpendicularmente à superfície da lâmina foliar, exceto em *P. fulgens*, onde esta camada apresentou células de tamanho reduzido (Fig. 4d). O parênquima lacunoso se apresenta junto à face abaxial com uma variação de 3 a 4 camadas de células (Fig. 4a, c, d e e). O bordo foliar é ligeiramente flexionado para a face abaxial. Nesta região, as células do parênquima clorofiliano reduzem gradualmente em tamanho e são substituídas por células de parênquima aclorofilado que preenchem as margens, como pode ser visto em *P. rudgeoides* (Fig. 4g). Idioblastos contendo cristais prismáticos foram observados somente em *P. longipedunculata* (*P. long\_Ita*) (Figs. 4h e i), (Tabela 4).

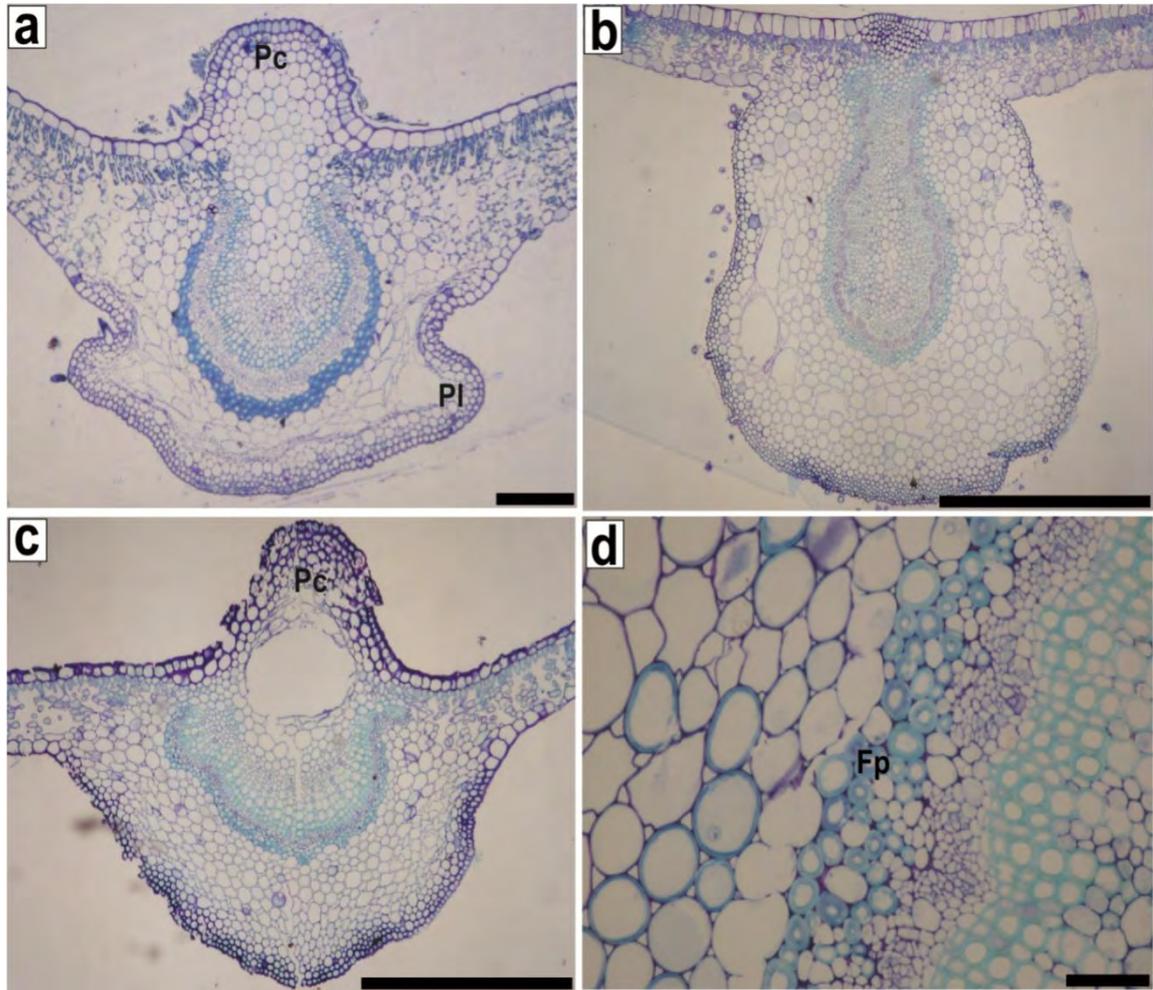
**Figura 4** - Microscopia Óptica - seção transversal e vista frontal da epiderme dissociada da folha de espécies de *Palicourea*.



### **Anatomia da região intercostal**

A seção transversal mostra que o contorno da região mediana da lâmina foliar é biconvexo na maioria das espécies (Tabela 4), como pode ser visto nas imagens de *P. tetraphylla* (*P. Tetr 1*) e *P. marcgravii* (*P.marc\_ES*) (Figs. 5a, c) e é plano-convexo em *P. fulgens* (Fig. 5b). A região intercostal tem um córtex composto por colênquima angular e/ou anelar externamente e parênquima fundamental internamente, como visto em *P. tetraphylla* (figura 5a), com exceção de *P. longipedunculata* (*P.long\_Ter*) e *P. marcgravii* (*P. marc\_ES*) (Fig. 5c). O parênquima paliçádico apresenta continuidade apenas em *P. fulgens* (Fig. 5b). A região intercostal exhibe projeções laterais (Pl) e uma projeção central (Pc) em *P. tetraphylla* (Fig. 5a), *P. marcgravii* (Fig. 5c) e *P. rudgeoides*. O sistema vascular é colateral e rodeado por fibras perivasculares (Fp) em todas as espécies (Fig. 5d). Em *P. longipedunculata* e *P. marcgravii* (Fig. 5c), o sistema vascular central é em forma de arco (Tabela 4). Outras espécies, tais como *P. fulgens* (Fig.5b), têm sistema vascular em forma de U (Tabela 4). Tricomas foram observados em *P. longipedunculata* (*P. long\_Ita*), *P. marcgravii* (*P. marc\_Ita*), *P. rudgeoides* (*P. rud1 e 2*) e *P. tetraphylla* (*P. tetr 1*) (Tabela 4). Idioblastos com cristais prismáticos foram observados em *P. guianensis*, *P. longipedunculata* (*P.long\_Ter*) e *P. marcgravii* (*P.marc\_ES*) (Tabela 4).

**Figura 5** - Microscopia Óptica - seção transversal da região intercostal de espécies de *Palicourea*.

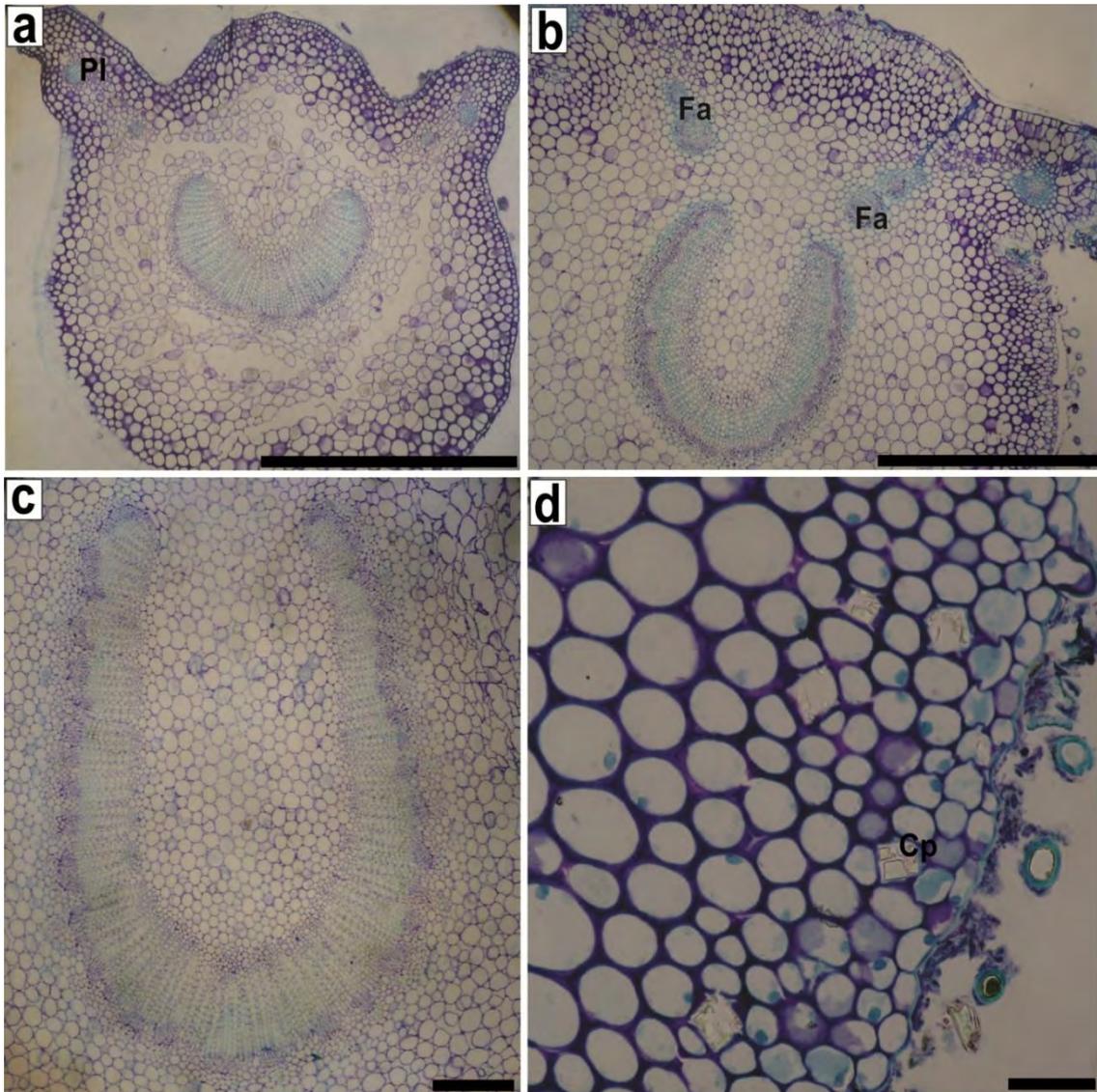


Legenda: Cortes transversais da região intercostal. **a:** *P. tetraphylla* (coletada em 2013). **b:** *P. fulgens*. **c:** *P. marcgravii* (coletada no Espírito Santo). **d:** *P. guianensis*. Projeção central (Pc), projeção lateral (Pl), fibra perivascular (Fp). Barras: a: 500  $\mu\text{m}$ ; b, c e d = 50  $\mu\text{m}$ .

### Anatomia do pecíolo

Cortes transversais da região mediana mostram que o contorno do pecíolo é biconvexo em *P. longipedunculata*, *P. marcgravii* (Fig. 6a), *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* (Tabela 4) com projeções laterais (Pl) como visto na (Fig. 6a), a exceção foi *P. guianensis* que apresentam contorno circular, *P. fulgens* e *P. longipedunculata* (*P. long\_Ita*) que apresentam contorno plano-convexo (Tabela 4). Colênquima angular e/ou anelar está presente na região adjacente a epiderme. O sistema vascular é composto por um feixe central em forma de arco em *P. guianensis*, *P. longipedunculata* e *P. marcgravii* (Fig. 6a) (Tabela 4). As outras espécies mostram um feixe central em forma de U, como visto em *P. tetraphylla* (Fig. 6c). A organização do sistema vascular do pecíolo é semelhante à região intercostal; os elementos condutores do xilema estão em série radial separados por células do parênquima; feixes acessórios foram encontrados em diferentes intensidades em todas as espécies. Observou-se também a presença de cristais prismáticos (Tabela 4) como observado em *P. fulgens* (Fig. 6d) e feixes de ráfides (Tabela 4). Tricomas tectores foram observados em *P. fulgens* e *P. tetraphylla* (Tabela 4).

**Figura 6** – Microscopia Óptica - seção transversal da região mediana do pecíolo.



Legenda: Cortes transversais da região mediana do pecíolo. **a:** *P. marcgravii* (coletada no Espírito Santo). **b:** *P. fulgens*. **c:** *P. tetraphylla*. **d:** *P. fulgens*. Projeção lateral (PI), feixe acessório (Fa), cristal prismático (Cp). Barras: a = 100  $\mu\text{m}$ ; b e d = 50  $\mu\text{m}$ ; c = 500  $\mu\text{m}$ .

Em microscopia óptica, cortes transversais da região intercostal da lâmina foliar, da região mediana da região intercostal e do pecíolo das seis espécies foram corados com reagentes específicos para identificação de: ligninas, celulose, lipídios totais, compostos pécnicos, substâncias fenólicas, alcaloides, ácidos graxos, terpenoides, polissacarídeos gerais e proteínas.

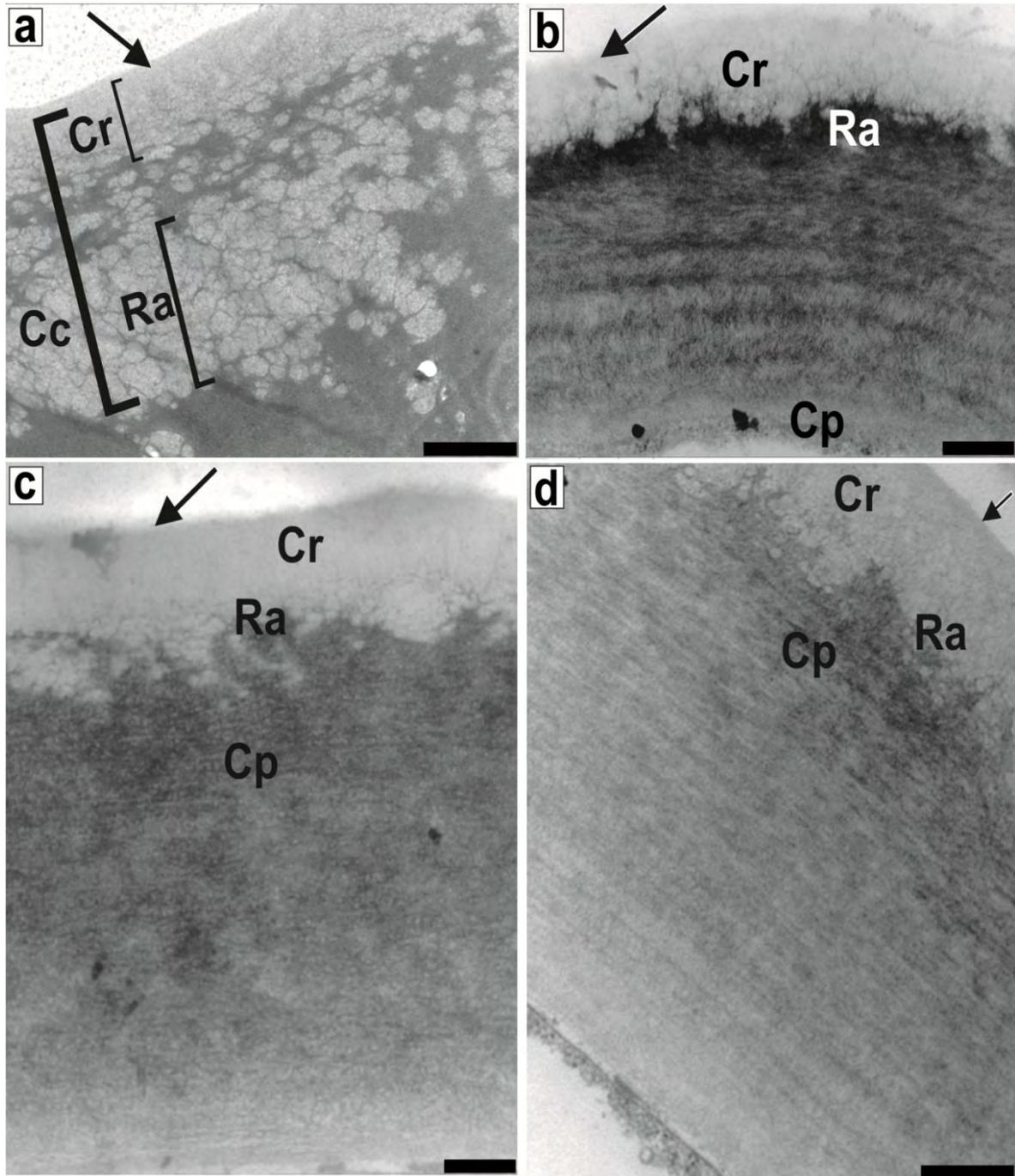
A reação com safrablau foi positiva corando a lignina em vermelho e celulose de azul, resultado observado nos cortes de região intercostal (Fig. 7b) e pecíolo (Fig. 7c). Na coloração com Sudan III, os lipídeos distribuem-se sobre a face adaxial das células epidérmicas (Fig. 7d) e como gotículas dispersas pelas células parenquimáticas (Fig. 7e). Na coloração com Sudan IV, os lipídeos distribuem-se sobre a face adaxial das células epidérmicas, e também nos tricomas (Fig. 7f). Grãos de amido foram evidenciados, no teste com lugol, ao redor do feixe vascular central do pecíolo (Fig. 7g) e nas células parenquimáticas (Fig. 7h). Os compostos pécnicos nas paredes das células do colênquima da região interccostal foram revelados pelo vermelho de Rutênio (Fig. 7i), sobre as células epidérmicas e tricomas (Fig. 7j). Substâncias fenólicas foram reveladas pelo reagente dicromato de potássio apresentando uma coloração suave nas células parenquimáticas do pecíolo e nas células do colênquima da região intercostal (Fig. 7k). Foi detectada a presença de ácidos graxos sobre as células epidérmicas da face adaxial (Fig. 7l). Os óleos essenciais foram revelados pelo reagente de Nadi em azul nas células epidérmicas da face adaxial (Fig. 7m). A presença de lignina foi revelada pela floroglucina na cor vinho nas fibras perivasculares do pecíolo (Fig. 7n). Não foram observadas reações indicativas da presença de alcaloide nos testes realizados com Dragendorff.



### Ultraestrutura

Em microscopia eletrônica de transmissão, foi observada a organização da parede periclinal externa da epiderme adaxial. Nota-se nestes cortes ultrafinos que a parede periclinal externa é recoberta por uma fina camada de cera epicuticular e três outras camadas morfológicamente distintas: a camada interna rica em polissacarídeos composta principalmente de celulose; camada cuticular intermediária arborescente rica em polissacarídeos imersa numa matriz de cutina; e uma camada de cutícula propriamente dita (Fig. 8a-d). Esta é homogênea e relativamente elétrôn- luscente. A camada cuticular (Cc) foi subdividida em camada reticulada (Cr), composta por uma matriz de cutina e região arborescente (Ra), composta de polissacarídeos e pectinas. As espécies estudadas apresentaram diferenças na organização da camada cuticular com as camadas arborescentes mais proeminentes na superfície adaxial (Fig. 8a-d). A camada mais interna rica em polissacarídeo (Cp) é composta principalmente de celulose. Em *P. tetraphylla* (Fig. 8a), a camada cuticular é intercalada com regiões vesiculares, presentes, principalmente, na camada arborescente. Em *P. longipedunculata* (Fig. 8b), as duas camadas reticulares e arborescentes são mais homogêneas e compactas. Em *P. fulgens* (Fig. 8c) e *P. rudgeoides* (Fig. 8d), a organização da camada cuticular em arborescente e reticulada é menos evidente.

**Figura 8** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de espécies de *Palicourea*.



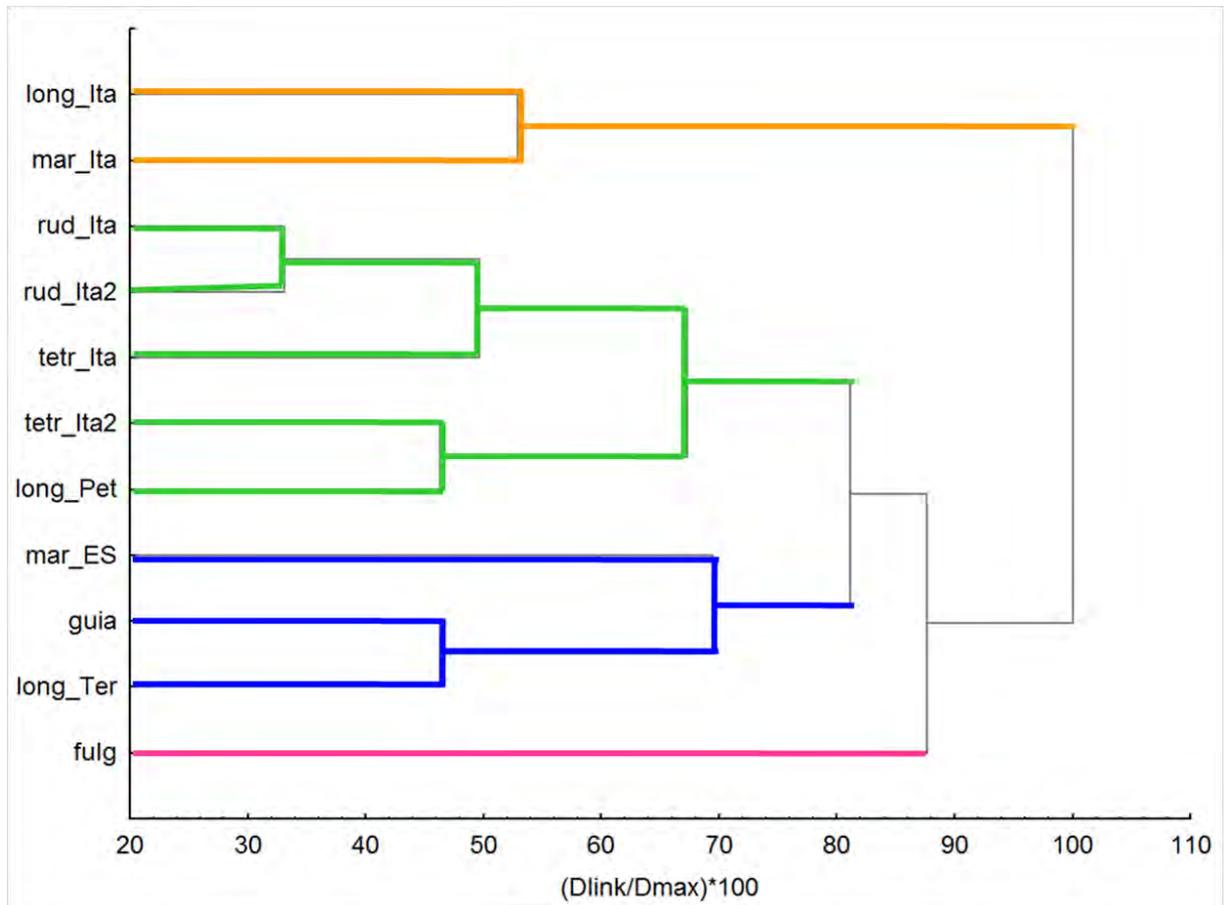
Legenda: Cortes transversais da lâmina foliar de espécies de *Palicourea* mostrando a organização da parede periclinal externa da epiderme adaxial. **a:** *P. tetraphylla*. **b:** *P. longipedunculata* (coletada em Teresópolis). **c:** *P. fulgens*. **d:** *P. rudgeoides*. Cutícula propriamente dita (setas), camada cuticular (Cc), camada reticulada (Cr), região arborescente (Ra), camada polissacarídica (Cp). Barras: a e d = 1  $\mu\text{m}$ ; b = 50  $\mu\text{m}$ ; c = 500  $\mu\text{m}$ .

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas mostraram a relação entre as espécies de acordo com os caracteres morfoanatômicos avaliados na tabela 4. A análise de agrupamento UPGMA dividiu as espécies estudadas em quatro grupos indicados pelas cores alaranjado, verde, azul e rosa (Fig. 9). O grupo mais similar (maior do que 50% de similaridade) é composto por *P. rudgeoides*, *P. tetraphylla* e *P. longipedunculata*, coloridas em verde (rud\_Ita; rud\_Ita2; tetr\_Ita; tetr\_Ita2; long\_Pet).

O segundo grupo é composto por *P. marcgravii*, *P. guianensis* e *P. longipedunculata*, coloridas em azul (mar\_ES; guia; long\_Ter). *P. fulgens* colorida em rosa (fulg), ficou separada desses dois grupos com cerca de 90% de dissimilaridade, devido contorno plano-convexo do pecíolo e da região intercostal e ausência de papilas. Além disso, *P. fulgens* (fulg) ficou distante (95% dissimilaridade) do grupo formado por *P. longipedunculata* and *P. marcgravii*, colorida em alaranjado (long\_Ita; mar\_Ita) devido ao sistema vascular em “U” no pecíolo.

**Figura 9:** Análise de agrupamento UPGMA.

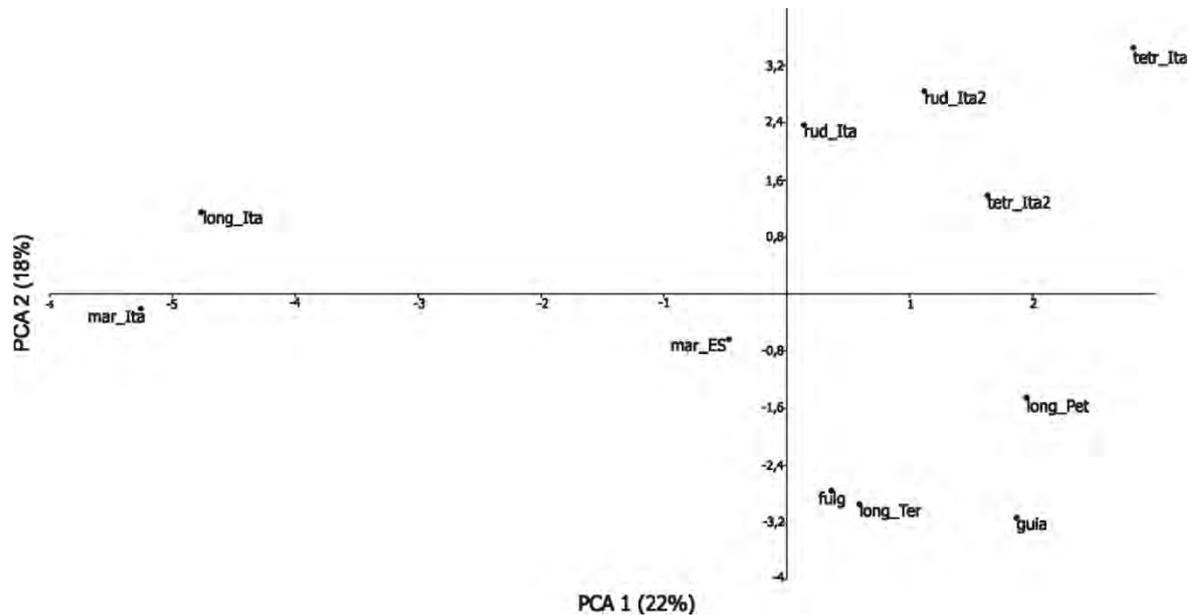


Legenda: Fenograma com as relações fenéticas entre as características anatômicas e micromorfológica das folhas de espécies de *Palicourea* com base em análise de cluster UPGMA.

Os resultados da análise de PCA apoiam a distinção dos quatro grupos da análise de agrupamento UPGMA, (Fig. 10), que destaca a distância fenética de *P. longipedunculata* e *P. marcgravii* do coeso grupo composto por *P. rudgeoides*, seguido por *P. tetraphylla* e *P. longipedunculata*. O primeiro e segundo componentes representam 40 % da variância entre as espécies. O primeiro componente foi responsável por 22 % da variância total baseado em características como sistema vascular do pecíolo e da região intercostal em “U”, superfície adaxial da lamina foliar papilosa. O segundo componente foi responsável por 18 % da variância total baseado em características como feixes de ráfides, feixe vascular em arco, camada lisa de cera epicuticular, cristais prismáticos e contorno biconvexo do pecíolo. Foram

feitas duas coletas de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* no mesmo local, mas em diferentes anos, rud\_Ita (coletada em 2013) and rud\_Ita2 (coletada em 2011). Estas espécies ficam ligeiramente separadas no fenograma devido a características como: feixes de ráfides no pecíolo, ornamentações nos tricomas tectores e na face adaxial da lâmina foliar de rud\_Ita. Em rud\_Ita2 as características foram: presença de cristais prismáticos no pecíolo e uma camada lisa de cera epicuticular na superfície abaxial. Em relação *P. tetraphylla*, tetr\_Ita (coletada em 2013) e tetr\_Ita2 (coletada em 2011) foram separadas no fenograma devido a características como: contorno biconvexo e presença de cristais prismáticos no pecíolo, cera epicuticular em crosta e tricomas tectores na superfície adaxial de tetr\_Ita. Em tetr\_Ita2, as diferentes características foram: contorno circular do pecíolo, tricoma tector na região intercostal, parede anticlinal reta na superfície adaxial e abaxial ornamentada.

**Figura 10:** Análise de Componente Principal.



Legenda: *Palicourea longipedunculata* coletada em Itatiaia (long\_Ita), *P. marcgravii* coletada no Espírito Santo (mar\_ES), *P. tetraphylla* coletada em 2013 (tetr\_Ita), *P. tetraphylla* coletada em 2011 (tetr\_Ita2), *P. rudgeoides* coletada em 2013 (tetr\_rud), *P. rudgeoides* coletada em 2011 (tetr\_rud2), *P. longipedunculata* coletada em Petrópolis (long\_Pet), *P. longipedunculata* coletada em Teresópolis (long\_Ter), *P. fulgens* (fug) e *P. guianensis* (guia).

### 3.4 Discussão

Em geral, o estudo anatômico, micromorfológico e ultraestrutural das folhas analisadas neste trabalho, mostram caracteres comuns a Rubiaceae como estômatos paracíticos, também chamado rubioide (BAHADUR et al. 1971), lâmina foliar hipoestomáticas e mesofilo dorsiventral (SOLEREDER 1908; METCALFE; CHALK 1950; ROBBRECHT 1988). Além de caracteres que podem ser interpretados como resultado da adaptação ao ambiente tais como presença de papilas, e variação na, espessura da cutícula e da lâmina foliar.

Em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar presença de micro-organismos, cera epicuticular, ornamentações cuticulares, papilas, tricomas e estômatos na epiderme das folhas. A composição e a intensidade de micro-organismos na superfície foliar normalmente são influenciadas por características genótípicas e por fatores ambientais como variações na temperatura, umidade, luminosidade, sazonalidade, acúmulo de metabólitos especiais e fatores genéticos como densidade de tricomas, espessura da cutícula e esclerênquima. A disponibilidade de nutrientes pode ser determinante na composição da microbiota epífita e pode também ajudar a prevenir contra infecções nas folhas (WYLIE 1951; ANDREWS; HARRIS 2000; DICKINSON 2000). Nas espécies estudadas, observou-se uma elevada quantidade de micro-organismos na superfície das folhas, como hifas que foram claramente observadas em *P. fulgens* e *P. tetraphylla*, o que provavelmente está relacionado ao ambiente úmido da Mata Atlântica onde as plantas foram coletadas.

A ornamentação da cutícula e a disposição de cera são consideradas importantes para diagnóstico em estudos de anatomia foliar (ESAÚ 1974; FAHN 1990, METCALFE; CHALK 1988). Moraes e colaboradores (2009, 2011) empregaram características como a ornamentação da cutícula para segregar espécies de *Simira* e *Bathysa* (Rubiaceae). Diferente de outras espécies, *P. fulgens* mostra ornamentação cuticular homogênea na superfície adaxial, que indica ser uma característica da espécie. Analisando 226 espécies de dicotiledôneas, Dunn e colaboradores (1965) registraram a ocorrência de uma cutícula ornamentada na maioria das espécies de ambientes xéricos e cutícula lisa naquelas de ambientes méxicos. *P. rudgeoides*, coletada em local sombreado e próxima ao rio, não apresenta ornamentações cuticulares, e, portanto, tem características normalmente observadas em ambiente méxico. No entanto, os resultados obtidos para outras espécies estudadas neste trabalho estão em desacordo com os de Dunn e colaboradores (1965) apresentando cutícula ornamentada coletada em um ambiente com disponibilidade de água, o que sugere que este pode ser um caráter genético. De acordo com os resultados, espécies de *Palicourea* exibem características do ambiente méxicos.

A disposição da cera epicuticular ocorre usualmente em camadas finas da qual podem emergir estruturas cristalinas de diversos formatos (BARTHLOTT et al. 1998). Machado e Barros (1995) mencionam que na mesma espécie pode-se observar variação nos tipos de cera, como em *P. rudgeoides*, que mostrou regiões, na superfície abaxial, com e sem ornamentações. *P. tetraphylla* coletada em 2011, apresenta cera lisa e a coletada em 2013, cera ornamentada. A morfologia da cera sua quantidade e distribuição podem sofrer modificações genéticas impostas pelas condições ambientais (BARTHLOTT et al. 1998). Isto pode explicar porque espécies de *P. tetraphylla* coletadas em áreas com alta intensidade luminosa possuem papilas ornamentadas.

Tricomas podem ser utilizados com finalidades taxonômicas (METCALFE; CHALK 1988) ecológicas e evolutivas (GOMES; NEVES 2009). A presença de características dos tricomas tem sido utilizada na taxonomia de Rubiaceae (ROBBRECHT 1988). Tricomas tectores são atribuídos a diversas funções como: contribuição à regulação da temperatura da planta, contribuição à reflexão luminosa incluindo radiação ultravioleta, barreira ao deslocamento de insetos na superfície, redução da perda de água e orientação de polinizadores (WAGNER et al. 2004). Neste estudo, foram observadas diferenças no tamanho dos tricomas e na ornamentação, como em *P. guianensis*, *P. fulgens* e *P. tetraphylla*. Embora a ornamentação dos tricomas já tenha sido utilizada como parâmetro diagnóstico para separar espécies em outros gêneros de Rubiaceae (MORAES et al. 2009; 2011), neste trabalho, não permitiu a segregação das espécies analisadas, pois os tricomas sempre apresentaram características similares.

Estômatos foram observados somente na face abaxial das espécies analisadas. Essa característica também foi observada em trabalhos que analisaram a anatomia foliar de outras espécies de Rubiaceae na Mata Atlântica (VIEIRA et al. 1992; GOMES et al. 1995; MORAES et al. 2009; 2011). Coutinho (1962) ressaltou o caráter usual do hipoestomatismo em espécies da floresta pluvial tropical. O autor acredita que tal fato possa ser atribuído à proteção contra o recobrimento das fendas estomáticas por pequenos musgos, hepáticas, líquens e outros componentes da flora epifítica.

Embora os estômatos paracíticos sejam considerados típicos para Rubiaceae (SOLEREDER 1908; METCALFE; CHALK 1950), neste trabalho, além dos estômatos paracíticos, foram observados estômatos do tipo paralelocítico nas espécies analisadas. A presença simultânea desses dois tipos de estômatos, também já foi descrita em outros gêneros da família, como a *Psychotria* (MORAES et al. 2009; 2011) e *Posoqueria* (ARRUDA; GOMES 2010).

Papilas são constituídas por uma única célula e são caracterizadas pela projeção da parede celular periclinal externa, podendo ser ornamentada ou não (WILKINSON 1979). *P. tetraphylla*, *P. longipedunculata*, *P. marcgravii*, *P. guianensis* e *P. rudgeoides* apresentam papilas na face adaxial da epiderme, mas apenas em *P. rudgeoides*, as papilas não se mostram ornamentadas. Papilas representam um mecanismo adaptativo importante para suprir as necessidades da fotossíntese, visto que no interior da floresta a luminosidade é reduzida (NEINHUIS; BARTHLOTT 1997). Considerando que o ambiente das espécies deste trabalho proporciona grande disponibilidade de água, pode-se inferir que as papilas atuam como lentes conversoras de estímulos luminosos para o mesófilo, atendendo assim às necessidades do processo fotossintético (HABERLANDT 1914). Outros autores também relatam essa relação da quantidade de água na lâmina foliar com a presença de papilas em espécies de Rubiaceae da Floresta Atlântica (VIEIRA; GOMES 1995; MORAES et al. 2011). Pereira (2003), em seu trabalho sobre morfoanatomia foliar de *P. longipedunculata* pertencente a um remanescente de Floresta Atlântica do estado de Minas Gerais, caracterizou papilas na face adaxial desta espécie. Na *P. longipedunculata*, coletada em Itatiaia, não foram observadas papilas. Este resultado sugere que nesta espécie a presença de papilas pode ser uma característica influenciada pelo ambiente, uma vez que a mesma espécie coletadas em Petrópolis e Teresópolis apresentam papilas, assim como no trabalho de Pereira (2003).

A formação de cristais de oxalato de cálcio é um processo complexo que pode ter valor taxonômico. Como exemplo, relata-se que na subfamília Rubioideae os cristais prismáticos e ráfides são considerados como marcadores clássicos (JANSEN et al 2003; ANDERSSON; ANTONELLI 2005; ROBBRECHT; MANEN 2006). Assim, há um consenso de que todos os gêneros de Rubioideae, incluindo *Palicourea* (METCALFE; CHALK 1989), possuem pelo menos ráfides. A produção ou não também pode depender de fatores como disposição de cálcio no solo, ou até mesmo serem estimulados pela predação. Muitas vezes um indivíduo pode não produzir cristais por esses motivos, ou produzir mais cristais em um tecido do que em outro (SOLEREDER 1908). Em *P. longipedunculata* (*P. long\_Pet*), *P. rudgeoide* e *P. tetraphylla* não foram observadas ráfides. Solereder (1893) revelou a presença e composição de cristais em 200 gêneros de Rubiaceae e demonstrou que a distribuição de drusas, estilóides e cristais prismáticos não está relacionada com a delimitação de tribos e gêneros dessa família. Porém de acordo com Metcalfe e Chalk (1950), a distribuição dos cristais pode ser útil na determinação de gêneros. Ráfides foram observadas em três espécies deste estudo e a sua associação com cristais prismáticos, apenas em *P. longipedunculata* pode ser considerado como parâmetro útil de segregação em nível de espécie.

O sistema vascular do pecíolo é uma característica distintiva amplamente utilizada na taxonomia (HARE 1942), inclusive de Rubiaceae (MARTÍNEZ-CABRERA et al. 2009). Todas as espécies analisadas em nosso estudo têm morfologia em conformidade com as características comuns à família, como a presença de feixes acessórios e um feixe central que pode ser circular (METCALFE; CHALK 1950) ou em forma de arco como observado para algumas espécies deste trabalho e outras espécies da família como *Psychotria viridis* (QUINTEIRO et al. 2006) e *Psychotria carthagenensis* (VITARELLI 2008). As diferenças encontradas neste trabalho foram no formato do sistema vascular que se mostrou quer em forma de “U” ou em forma de arco.

A parede periclinal externa é organizada de modo a formar camadas de composição variada. Essa composição já foi utilizada como base para a diferenciação taxonômica em vários níveis hierárquicos (BRAGA; DIETRICH 1999). Entre as espécies analisadas neste trabalho, a característica que mais variou foi a espessura da camada arborescente. A análise ultraestrutural das espécies examinadas exibe uma distribuição heterogênea dos seus componentes, tendo um nome atribuído para cada camada. Foi observada a região arborescente com uma camada mais espessa e vesículas cuticulares translúcidas, tais como em *P. tetraphylla*, ao passo que a região arborescente foi menor em outras espécies, tais como *P. longipedunculata*, *P. rudgeoides* e *P. fulgens*. Essas diferenças nas camadas cuticulares podem ser determinadas para essa espécie, ou uma característica influenciada pelo meio ambiente, uma vez que altas temperaturas podem causar modificações na parede celular (KO; HAN 2004).

A circunscrição atual de Palicoureeae inclui oito gêneros amplamente aceitos: *Carapichea*, *Chassalia*, *Geophila*, *Hymenocoleus*, *Margaritopsis*, *Notopleura*, *Palicourea* e *Rudgea*. Portanto, estudos que envolvem características anatômicas interespecíficas entre os grupos são importantes para obter dados para os estudos da tribo (MORAES et al. 2011, MARQUES et al. 2015). Ao considerar os dados compilados, conclui-se que a anatomia e micromorfologia das folhas dos grupos interespecíficos e espécies estudadas podem ser usadas como caracteres de diagnóstico para o gênero. Os caracteres que contribuíram para a formação dos grupos foram o contorno do pecíolo e região intercostal, sistema vascular em "U" ou em arco, superfície adaxial com papilas, ráfides ou cristais prismáticos, camada lisa de cera epicuticular; tricomas tectores superfície adaxial e uma camada lisa de cera epicuticular. Assim, estes dados podem contribuir para o diagnóstico do gênero.

Os resultados da análise dos componentes principais (PCA) dos dados anatômicos mostraram uma diferença considerável entre as espécies de *Palicourea* analisadas. Estes

resultados mostram que as características da lâmina foliar devem ser analisadas com cautela para fins taxonômicos. Alguns estudos corroboram com a proximidade dos gêneros, e já transferiram algumas espécies de *Psychotria* para *Palicourea* (TAYLOR et al. 2010; BORHIDI 2011). Os resultados da análise dos dados anatômicos em espécies de *Psychotria* e *Palicourea* afirmam a proximidade dos gêneros (MORAES et al. 2011). Mais estudos precisam ser realizados, a fim de apoiar esta classificação.

O grupo da análise multivariada mais próximo com mais de 50% de semelhança, foi formado por *P. rudgeoides*, seguido por *P. longipedunculata* (long\_Pet) e *P. tetraphylla*. A semelhança entre estas pode indicar que estão intimamente relacionados com as espécies do gênero *Palicourea*, uma vez que foram coletadas em diferentes fragmentos florestais. O grupo 2 foi formado por *P. guianensis*, *P. longipedunculata* (long\_Ter) e *P. marcgravii* (mar\_ES), que ficou um pouco mais afastada do grupo, mas ainda próxima de *P. longipedunculata* mesmo tendo sido coletadas em diferentes sítios de ocorrência. Assim como foi mar\_Ita e long\_Ita, indicando que estes estão intimamente relacionados com as espécies dentro do gênero independente de influências ambientais. A distância do terceiro grupo *P. longipedunculata* (long\_Ita) e *P. marcgravii* (mar\_Ita) pode ser explicada pela semelhança aparente que existe entre as duas espécies e, neste caso, a influência do mesmo ambiente, ou seja, o mesmo local de coleta. Este fato também revela que espécies amostradas em Itatiaia parecem ser mais homogêneas em relação às características anatômicas. A distância de *P. fulgens* para as espécies estudadas no mesmo sítio de coleta revela como a plasticidade foliar pode produzir diferenças entre as espécies, mesmo sendo do mesmo gênero e estando sobre as mesmas influências ambientais. O afastamento das espécies que se repetiram como *P. longipedunculata* e *P. marcgravii*, pode ser justificado pelos diferentes locais em que foram coletadas, evidenciando que o genoma sofre ação do ambiente. Características como papila, tricoma, feixe de ráfide, cristais prismáticos, formato do sistema vascular da região intercostal e contorno do pecíolo fizeram com que as espécies de *P. longipedunculata* ficassem afastadas. E foram características como papila, parede anticlinal das células epidérmicas, cristais prismáticos e tricoma que posicionaram as espécies de *P. marcgravii* distantes uma da outra.

Nossos resultados revelaram características frequentemente associadas com a anatomia da família e, também, outras relacionadas a diferentes tipos de fatores ambientais como intensidade luminosa e disponibilidade de água. Este estudo mostrou a importância da anatomia foliar como uma ferramenta de diagnóstico para as seis espécies de *Palicourea*; enfatizando as características que indicam grupos infragenéricos e genéricos. *P. fulgens* ficou separada dos grupos devido ao contorno plano-convexo do pecíolo e da região intercostal e

ausência de papilas. Além disso, *P. fulgens* ficou mais distante do grupo formado por *P. longipedunculata* e *P. marcgravii* devido ao formato em "U" do sistema vascular do pecíolo. Neste sentido, os resultados alcançados neste trabalho ratificam a necessidade de ampliar os estudos comparativos deste e de outro gênero da atual circunscrição Palicoureeae, como suporte à revisão sistemática da subfamília Rubioideae.

## 4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIPARASITÁRIA DE *PALICOUREA MARCGRAVII*, *P. RUDGEOIDES* E *P. TETRAPHYLLA*

### 4.1 Introdução

Os protozoários parasitos e as leveduras são agentes causadores de diversas doenças com riscos variáveis a saúde humana. Se por um lado, as infecções podem manter-se assintomáticas, outras podem causar sérios danos à saúde ou até a morte se não forem tratadas. No entanto, uma crescente dificuldade no tratamento dessas infecções tem sido observada, seja pelos graves efeitos colaterais, ou seja, pela resistência desses microorganismos aos quimioterápicos utilizados atualmente (DONDORP et al. 2009; ALBERNAZ et al. 2010; TORRENT et al. 2012; PAPPAS 2011).

*Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, que afeta cerca de 25 milhões de pessoas que vivem em áreas de risco. Cerca de 10 milhões de pessoas estão atualmente infectadas com este parasito, resultando em mais de 15.000 mortes e 50.000 novos casos a cada ano (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE 2012). O ciclo de vida deste parasito envolve dois hospedeiros, um invertebrado (vetor) e um vertebrado, incluindo o homem, nos quais três principais formas evolutivas são encontradas (NOIREAU et al. 2005). No inseto, está a forma epimastigota e nos mamíferos, a tripomastigota sanguínea e a forma amastigota intracelular, que se multiplica no citoplasma de uma grande variedade de células, embora apresente um tropismo por células musculares (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM 2006). Ao final do ciclo de multiplicação intracelular, o parasito retoma a forma tripomastigota, rompe sua célula hospedeira e cai na corrente sanguínea quando invade novas células perpetuando a infecção (DEANE; LENZI; JANSEN 1984; TELLERIA et al. 2006).

Outro problema mundial é o alarmante aumento no número de infecções fúngicas. As leveduras são consideradas agentes patogênicos oportunistas, que podem determinar processos infecciosos de quadro assintomático à doença grave e fatal (REPENTIGNY; LEWANDOWSKI; JOLICOEUR 2004; ERKÖSE; ERTURAN 2007; HÖFLING et al. 2010). Anfotericina B, caspofungina equinocandina, derivados de azole fluconazol, itraconazol e voriconazol, são os agentes disponíveis para a administração de drogas para infecções graves (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL 2015). Porém, seus efeitos secundários, como o surgimento de fungos patogênicos oportunistas, o aumento da variedade de micoses e a recuperação de isolados resistentes a agentes antifúngicos promovem o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (triazóis e equinocandinas), bem como de formulações que atuam sobre os componentes lipídicos como a anfotericina B e nystatin (SANDVEN 2000;

DENNING 1997). O tratamento de infecções fúngicas é um desafio da prática médica, pois existem poucos medicamentos, o tratamento é longo, tem elevada toxicidade e nem sempre é eficiente (PORTILLO et al. 2001; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU 2011; SPAMPINATO; LEONARDI 2013).

Duarte e colaboradores (2007) relataram que, nos últimos anos, houve um aumento na pesquisa de produtos naturais ativos contra *Candida sp.* Existem cerca de 200 espécies descritas para o gênero, sendo cerca de 10% causadoras de doença, dentre estas, *Candida albicans* está associada às infecções fúngicas graves (SANDVEN 2000). Embora essa levedura seja a mais frequentemente envolvida em processos patológicos, existem ainda outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* (ERKÖSE; ERTURAN 2007; SARDI et al. 2010; HÖFLING et al. 2010). Além das infecções fúngicas associadas à saúde humana existem os fungos que são fitopatogênicos, como é o caso do *F. solani*, fungo que mais acomete doenças em plantas, é capaz de causar doenças como apodrecimento do caule de ervilha, síndrome da morte súbita da soja, podridão do pé de feijão e podridão seca de batata (LUGINBUHL, 2010). Segundo Farr; Rossman (2011) *F. solani* é uma das poucas espécies de *Fusarium* encontrados em vários tipos de solo de florestas tropicais, são observados em campos úmidos e áreas temperadas. Este fungo pode atingir um número diversificado de plantas hospedeiras, como leguminosas e outras plantas tropicais (LESLIE; SUMMERELL, 2006), dentre os registros de ocorrência nas culturas brasileiras temos o *Coffea arabica* (MENDES et al.1998). Portanto, a resistência dos parasitos e fungos frente aos medicamentos assim como dos insetos vetores aos inseticidas, justifica a busca por novos compostos capazes de combatê-los (DONDORP et al. 2009; WONG et al. 2015).

Sendo as plantas fontes promissoras de novos compostos ativos (DE MESQUITA et al. 2007; RODRIGUES et al. 2006; COELHO; AGRA; BARBOSA 2006; ESPINDOLA et al. 2004), é interessante a investigação de espécies pertencentes à famílias já descritas por possuírem marcadores quimiotaxômicos, como é o caso da família Rubiaceae (FIGUEIREDO et al. 2009; TOURÉ et al. 2010; KATO et al. 2012; RAMALINGUM; NELVANA; MAHOMOODALLY 2014).

*Palicourea* apresenta espécies com potencial ornamental, medicinal e fitotoxicológico utilizadas na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, tosse e dores de estômago, além de estarem incluídas na lista de plantas utilizadas contra o câncer (HARTWELL 1971). A investigação química deste gênero descreve a presença de várias classes de substâncias como cumarinas, ácidos benzóicos e terpenos (EL SEEDI 1999), além

de alcaloides (CARVALHO et al. 2006), alcaloides indólicos e quinolínicos (VALVERDE; TAMAYO; HESSE 1999). No entanto, pouco se sabe sobre a atividade biológica dos extratos deste gênero.

Muitas pesquisas são feitas usando epimastigota por ser facilmente cultivada in vitro e consequentemente usada nos estudos experimentais preliminares (TYLER; OLSON; ENGMAN 2002) Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito tóxico dos extratos foliares de *Palicourea marcgravii*; *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* a fim de verificar a ação sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* e avaliar a atividade antifúngica dos extratos contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Fusarium solani*.

## 4.2 Material e Métodos

### Material botânico

Folhas completamente expandidas de *Palicourea marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* foram coletadas no estado do Rio de Janeiro em julho de 2013. O material foi identificado pelo Dr. Sebastião José da Silva Neto e depositado no herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ).

**Tabela 5:** Espécies estudadas, número de identificação no herbário e sítio de coleta.

<b>Espécies</b>	<b>Número de identificação</b>	<b>Sítio de coleta</b>
<i>P. marcgravii</i>	HRJ-12442	Parque Nacional do Itatiaia
<i>P. rudgeoides</i>	HRJ-12444	Parque Nacional do Itatiaia
<i>P. tetraphylla</i>	HRJ-12445	Parque Nacional do Itatiaia

Legenda: HRJ = Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

### Secagem e moagem

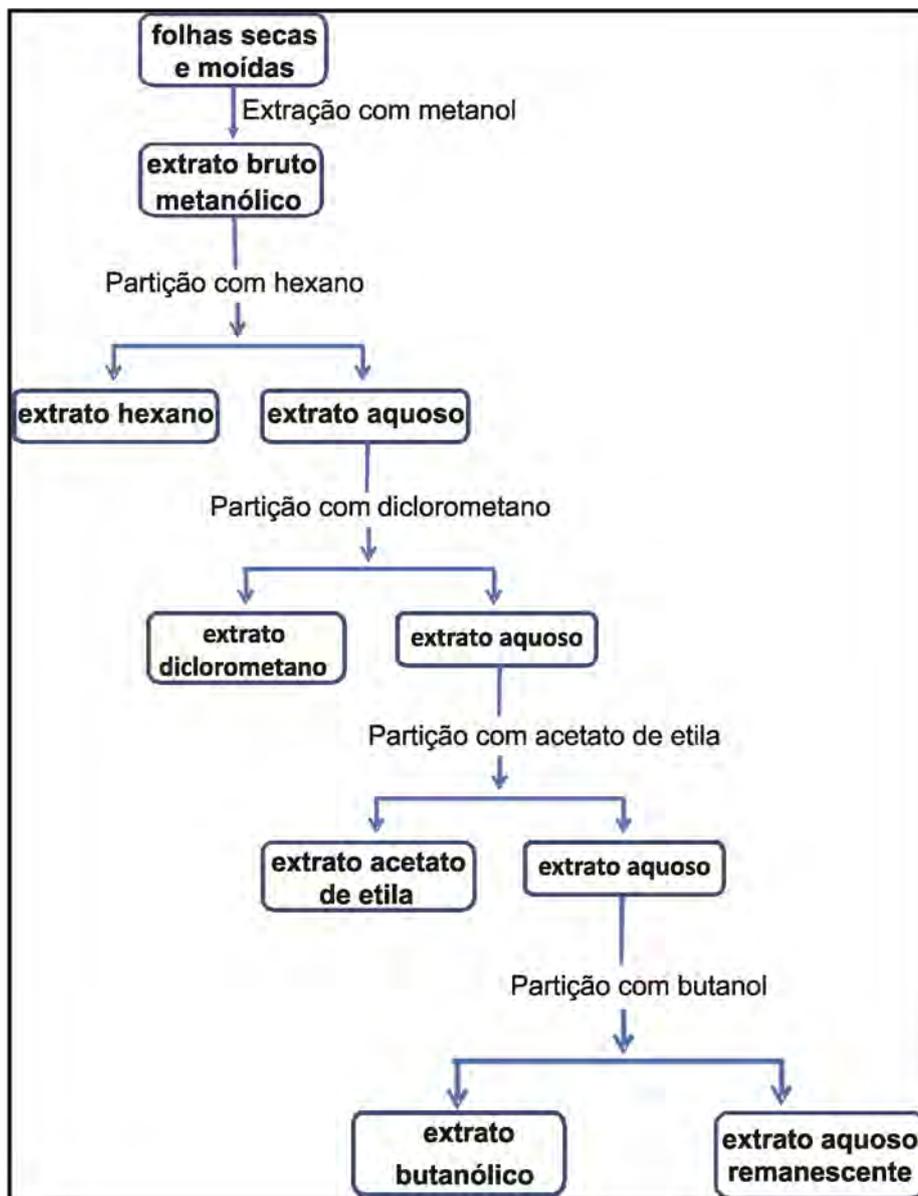
As folhas das três espécies foram secas em temperatura ambiente e pulverizada em moinho de facas com granulação definida.

### Extração dos solventes

O material botânico seco e pulverizado foi submetido à extração exaustiva em metanol. A filtração e evaporação do metanol à pressão reduzida conduziram ao extrato bruto metanólico (Vetec<sup>®</sup> dosagem 99,8%), a partir do qual, foram feitos os fracionamentos (Fig. 11), através da partição líquido-líquido, utilizando solventes como: hexano (Proquímios<sup>®</sup>

faixa de destilação 68-70°C), diclorometano (Vetec<sup>®</sup> dosagem 99,5%), acetato de etila (Vetec<sup>®</sup> dosagem 99,5%), álcool butílico (Proquímios<sup>®</sup> dosagem 99,5%) e água destilada. No total, foram seis extratos para cada espécie: extrato em metano (EMeOH), extrato em hexano (EHex), extrato em diclorometano (EDCM), extrato em acetato de etila (EAcOEt), extrato em álcool butílico (EBut) e extrato em água (EH<sub>2</sub>O). Para os testes antifúngicos e antiparasitários foram utilizados 0,004 g/ml de cada extrato.

**Figura 11** - Diagrama das etapas do fracionamento do extrato bruto metanólico das três espécies estudadas.



Legenda: Fracionamento feito a partir de 25,08 g do pó das folhas de *P. marcgravii*; 32,50 g de *P. rudgeoides* e 283,12 g de *P. tetraphylla*.

### **Fungos e manutenção**

As leveduras *Candida albicans* (CE022) e *Candida tropicalis* (CE017) e o fungo filamentosso *Fusarium solani* foram cultivados em meio Sabouraud (peptona 10g/L, D(+) glicose 20g/L, ágar-ágar 17g/L) (Merck S/A), mantidos a 23 °C e conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

### **Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido**

#### **Obtenção de esporos de fungo filamentosso e das células de leveduras**

O fungo *F. solani* foi transferido do estoque e colocado para crescer em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud por aproximadamente 15 dias a 30 °C. Após esse período, 10 mL de caldo Sabouraud foram vertidos sobre a placa contendo os fungos, e os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gases para evitar a passagem de restos miceliais que pudessem estar em solução juntamente com os esporos.

#### **Obtenção das células de leveduras**

Inóculos das células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram mantidas por um período de dois dias a 30 °C. Após este período, as células foram utilizadas no ensaio no qual, com o auxílio de uma alça de semeadura, colônias foram retiradas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura (caldo Sabouraud), para a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer através do uso de um microscópio óptico de campo claro como descrito no item acima.

### **Análise da inibição do crescimento fúngico**

Após quantificação, as células do fungo filamentosso *F. solani* e das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* ( $1 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em 200 µL de caldo Sabouraud contendo 250 µg.mL<sup>-1</sup> das amostras com os seis extratos de *P. marcgravi*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* dissolvidos em DMSO a 1%. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), incubadas a 30 °C por um período de 48 h para o fungo filamentosso e 24 h para as leveduras. Para a observação da inibição do crescimento dos fungos, foi determinada a densidade óptica calculada a partir de leituras em um leitor de

microplacas (EZ Read 400, Biochrom), a 620 nm a cada 6 h. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert e Terras (1990).

### **Cultura de parasitos**

Formas epimastigota do *T. cruzi* (cepa DM28) foram cultivadas em 5 mL de meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% FCS (Fetal bovine serum, Gibco) e 4% de hemina a 28 °C. A cada cinco dias, 1 mL dos parasitos ainda em fase exponencial era passado para um novo tubo, cujo volume era completado para 5 mL com meio de cultura novo.

### **Teste de citotoxicidade dos extratos totais nos epimastigotas**

Para cada extrato foi feita uma solução estoque de 8 mg/mL em meio de cultura e DMSO (1.5% V/V). Essa mistura foi agitada para melhor diluição dos extratos e esterilizada através de filtros com membrana 0,22 µm. Diferentes volumes da solução estoque foram incubados em placa de 96 poços a fim de se obter a concentração final dos extratos de 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL. Em adição, 100 µL de parasitos a uma densidade de  $3,6 \times 10^6$  foram adicionados por poço, e o volume final foi ajustado para 200 µL utilizando o meio de cultura. A placa contendo o experimento foi incubada a 28 °C por 24h. A quantificação dos parasitos foi feita na câmara de Neubauer. Após o primeiro ensaio, o extrato aquoso das três espécies foi escolhido para melhor investigar seus efeitos sobre os parasitos, com tempos adicionais de 8h e 16h.

### **Microscopia Óptica**

Para a análise morfológica, a forma epimastigota de *T. cruzi* foi centrifugada a 1.700 rpm durante 10 minutos, lavadas com PBS, pH 7,2, à temperatura ambiente. Os parasitos foram fixados numa solução contendo paraformaldeído a 4% diluído em PBS e corados com Giemsa (10% v / v) durante 2 h à temperatura ambiente. Uma alíquota de 100 µl foi espalhada numa lâmina microscópica, seca a 37 °C e observadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS), e documentadas por meio de imagens obtidas pela câmera Cannon Power Shot 14 MP (acoplada ao microscópio), com o auxílio do programa Axiovision (ZEISS).

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para análise da ultraestrutura as amostras tratadas com 100 µg/ mL do extrato aquoso por 24h foram centrifugadas por 10 minutos a 1700 RPM, lavadas com PBS por mais 10

minutos e centrifugados na mesma rotação. A fixação foi realizada utilizando-se 4% formaldeído, 1% glutaraldeído, tampão cacodilato de Sódio 0,2M, 1,5 ml de água destilada e 5% sacarose por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 1.700 RPM, lavadas com uma solução de tampão cacodilato de Sódio 0,1 M. O sedimento formado foi pós-fixado em tetróxido de Ósmio 2% e ferrocianeto de Potássio 0,8% por 1 h e meia em temperatura ambiente, protegido da luz. As amostras pós-fixadas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio e centrifugadas por duas vezes. As amostras foram desidratadas em uma série de acetona crescente: 50%, 70%, 90% e 100% (3 vezes). Após a desidratação as amostras foram incubadas em uma solução de resina acetona-epon 100% na proporção de 2:1, 1:1, 1:2 e resina epon pura por 6 h cada etapa. O material foi, então, incluído em epon e polimerizado em estufa 60 °C durante 48 h. Cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrotomo Reichert Ultratrin-Leica, e contrastados em acetato de uranila aquoso a 5% (20 min), no escuro, e em citrato de chumbo por 5 minutos. O material foi observado e fotografado no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss TEM 900, operando a uma aceleração de voltagem de 80 kV.

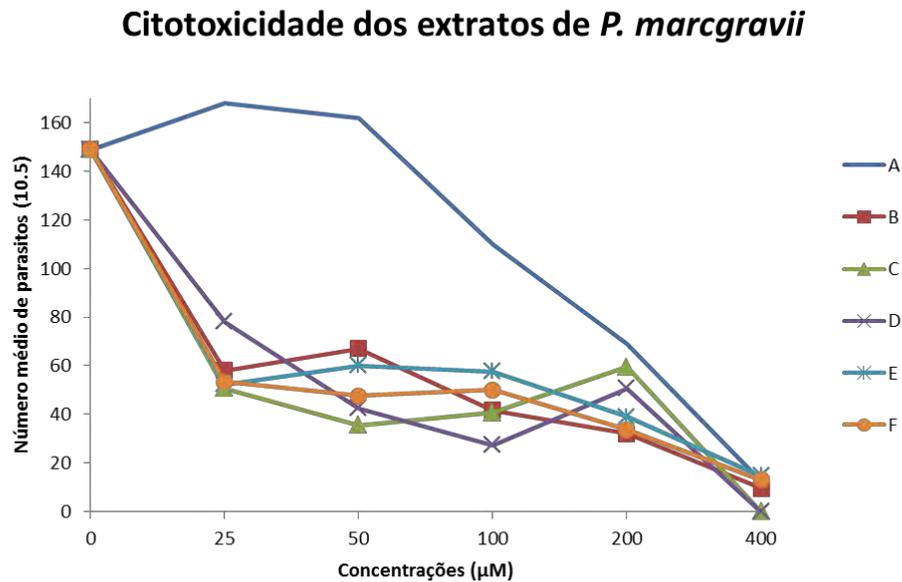
### 4.3 Resultados

Para avaliar a atividade de extratos de espécies do gênero *Palicourea* derivados de diferentes solventes, foram testadas dezoito amostras obtidas a partir de folhas de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* sobre epimastigotas de *T. cruzi*. Os epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram expostos aos extratos em diferentes concentrações (25-400 µg/mL) e a análise da toxicidade ao epimastigota foi avaliada através da alteração morfológica e eliminação do parasito.

#### Efeitos tóxicos das espécies do gênero *Palicourea*

Em relação a *P. marcgravii*, o EAcOEt reduziu 65% dos parasitos em 25 µg/mL, variando entre 67% a 78% nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, chegando a 92% em 400 µg/mL. O EH<sub>2</sub>O a 25 µg/mL reduziu 48% da população, variou de 67% a 72% nas concentrações entre 50-200 µg/mL e os efeitos tóxicos lineares com a concentração eliminaram todos os parasitos com 400 µg/mL. O mesmo foi observado para o EBut a 400 µg/mL, variando de 61% a 77% nas concentrações de 25- 200 µg/mL. O EDCM começou a ter efeito a partir de 100 µg/mL, inibindo 27% e continuou gradualmente chegando a 92% em 400 µg/mL. O EHex variou de 56% a 94%, entre 25-400 µg/mL, enquanto o EMeOH mostrou diminuição variando de 60% a 91% nestas mesmas concentrações (Gráfico 1).

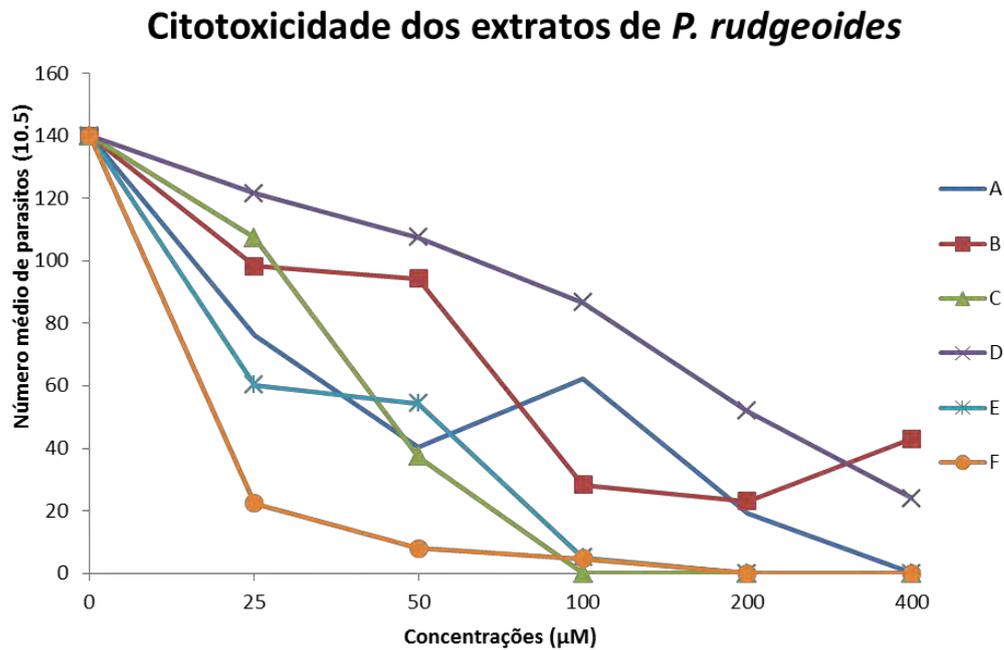
**Gráfico 1:** Efeitos das incubações por 24h dos extratos de *P. marcgravii* sobre o crescimento dos epimastigotas.



Legenda: A: extrato acetato de etila; B: extrato aquoso; C: extrato butanólico; D: extrato diclorometano; E: extrato hexânico; F: extrato metanólico.

Quanto a *P. rudgeoides*, o EAcoEt foi o mais eficaz dentre as três espécies com 85% de eliminação do parasito a 25 µg/mL, 95% a 50 µg/mL, 98% a 100 µg/mL, chegando a eliminação total em 200 µg/mL. Para o EH<sub>2</sub>O, a redução da população também foi progressiva variando de 14% a 39% nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL. O EBut teve resultado expressivo, com morte total em 100 µg/mL. O EDCM diminuiu a população de forma linear, variando de 46% a 25 µg/mL e 100% a 400 µg/mL. Para o EHex o melhor resultado foi a 200 µg/mL com 84% de eliminação. O EMeOH se mostrou eficaz chegando à inibição total na concentração de 200 µg/mL (Gráfico 2).

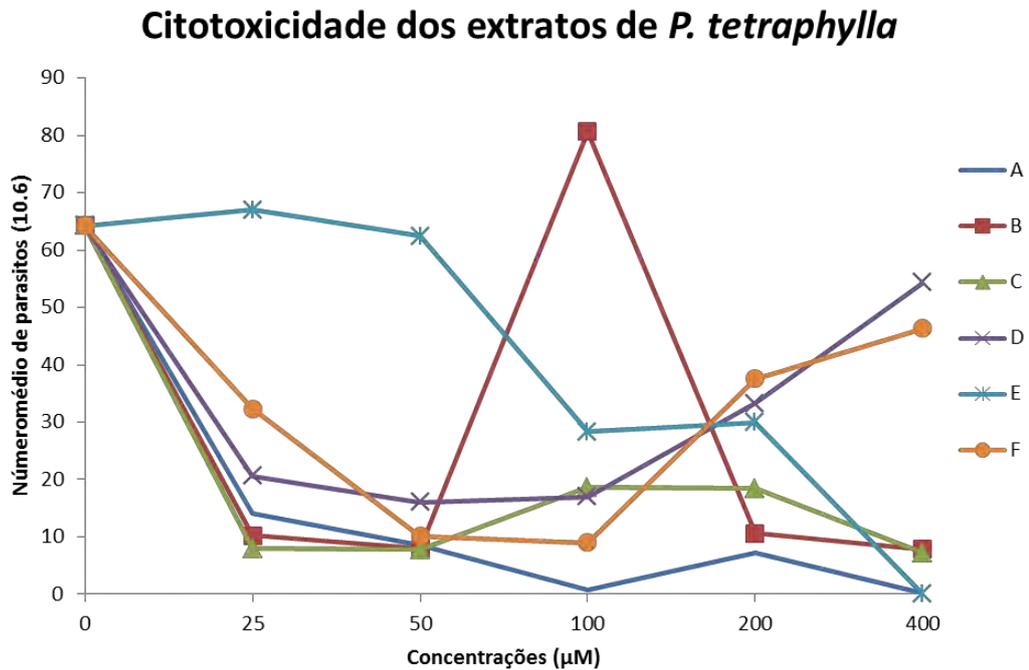
**Gráfico 2:** Efeito das incubações por 24h dos extratos de *P. rudgeoides* sobre o crescimento dos epimastigotas.



Legenda: A: extrato acetato de etila; B: extrato aquoso; C: extrato butanólico; D: extrato diclorometano; E: extrato hexânico; F: extrato metanólico.

Em relação a *P. tetraphylla*, o EAcOEt reduziu 50, 85, 87, 42 e 28% em 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, respectivamente. Já o EH<sub>2</sub>O mais eliminou (76%) em 50 µg/mL. O EBut pouco variou seus efeitos 72 a 89%, entre 25-400 µg/mL. O EDCM foi o mais eficaz, eliminando 100 % em 400 µg/mL e nas concentrações entre 25-200 variou de 87% a 99%. Quanto ao EHex, não houve diferença significativa entre as concentrações, cujos efeitos foram entre 84% e 88%. O EMeOH foi eficaz a partir de 100 µg/mL quando reduziu 56%, alcançando eliminação total em 400 µg/mL (Gráfico 3)

**Gráfico 3:** Efeito das incubações por 24h dos extratos de *P. tetraphylla* sobre o crescimento dos epimastigotas.



Legenda: A: extrato acetato de etila; B: extrato aquoso; C: extrato butanólico; D: extrato diclorometano; E: extrato hexânico; F: extrato metanólico.

### A cinética do processo de eliminação dos epimastigotas

Para saber a cinética de destruição do parasito escolhemos o EH<sub>2</sub>O na concentração 100 µg/mL, por ser a intermediária, e testamos em três tempos de incubação 8h, 16h e 24h (Fig. 11) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Cinética de eliminação dos epimastigotas

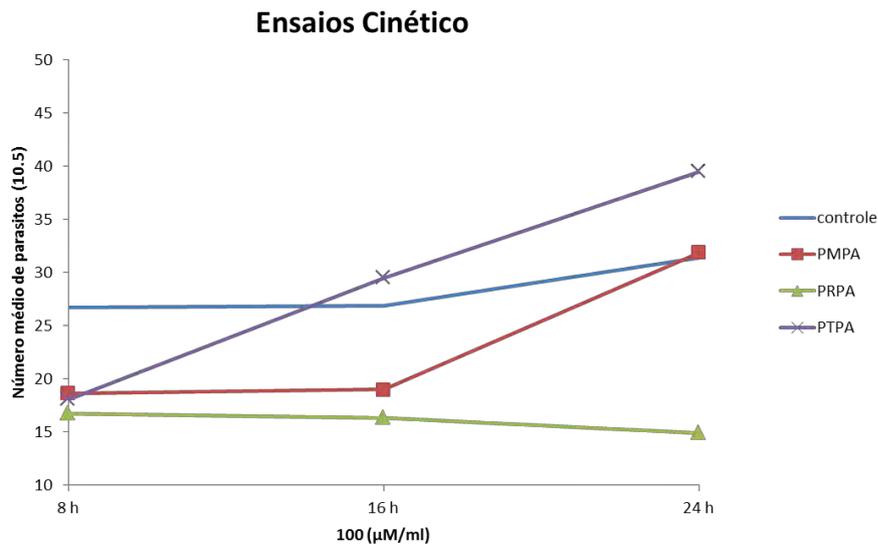
Tempo	Porcentagem de epimastigota			
	Controle	<i>P. marcgravii</i>	<i>P. rudgeoides</i>	<i>P. tetraphylla</i>
<b>8 horas</b>	26,75	18,66	16,75	18,08
<b>16 horas</b>	26,91	19	16,33	29,5
<b>24 horas</b>	31,41	31,91	14,91	39,5

Legenda: *Palicourea marcgravii* (*P. marcgravii*), *Palicourea rudgeoides* (*P. rudgeoides*), *Palicourea tetraphylla* (*P. tetraphylla*).

Para *P. marcgravii*, a redução em 8h foi a mesma que em 16h, no entanto, após este tempo os parasitos voltaram a se multiplicar, igualando ao controle. Já para *P. rudgeoides*, o

efeito foi o mesmo nos três tempos de tratamento, e o número de parasitos continuou constante. Para *P. tetraphylla*, só o tempo de 8h reduziu o número de epimastigota, que voltou a se proliferar em 16 h e continuou aumentando em 24 h.

**Gráfico 4:** Cinética de eliminação dos epimastigotas usando o extrato aquoso de espécies de *Palicourea*.

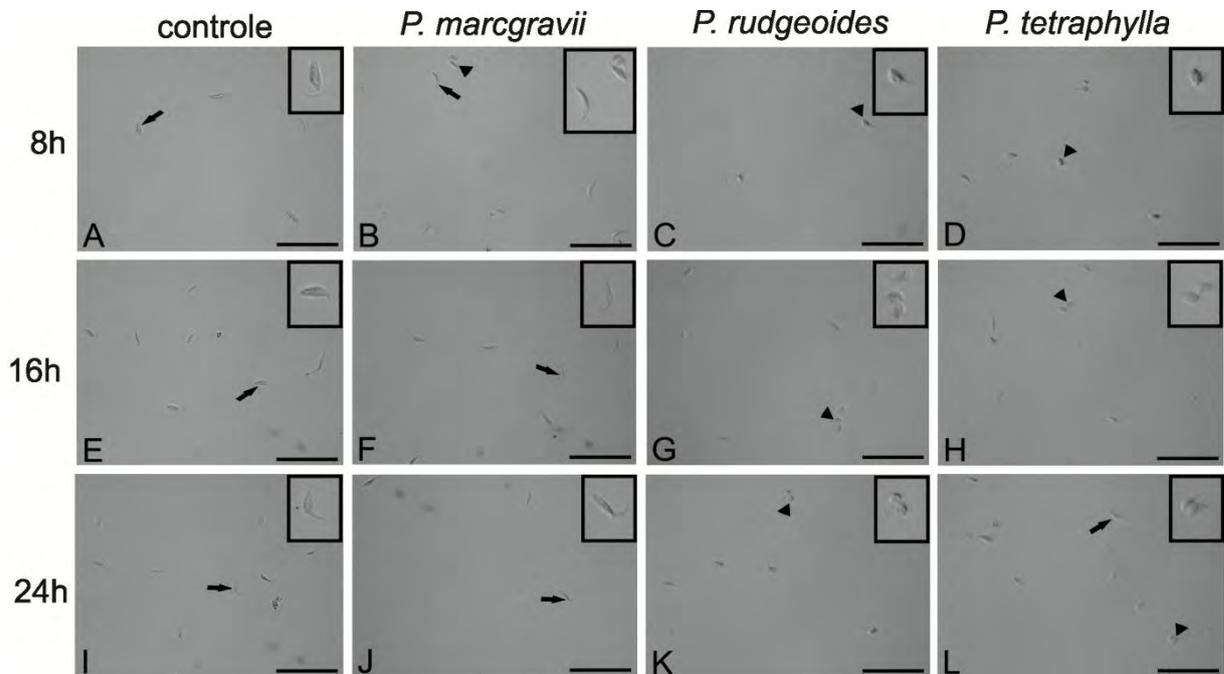


Legenda: PMPA: *Palicourea marcgravii* parte aquosa, PRPA: *Palicourea rudgeoides* parte aquosa, PTPA: *Palicourea tetraphylla* parte aquosa.

### Análises estruturais e ultraestruturais dos epimastigotas

Através da microscopia óptica foi observado que os epimastigota não tratados mostram uma forma alongada, típica do parasito, presença do flagelo, sem alterações visíveis (Fig. 11A, E e I). No entanto, na presença dos extratos aquosos incubados por diferentes tempos na concentração 100 µg/mL, os epimastigotas passaram a apresentar citoplasma bastante condensado.

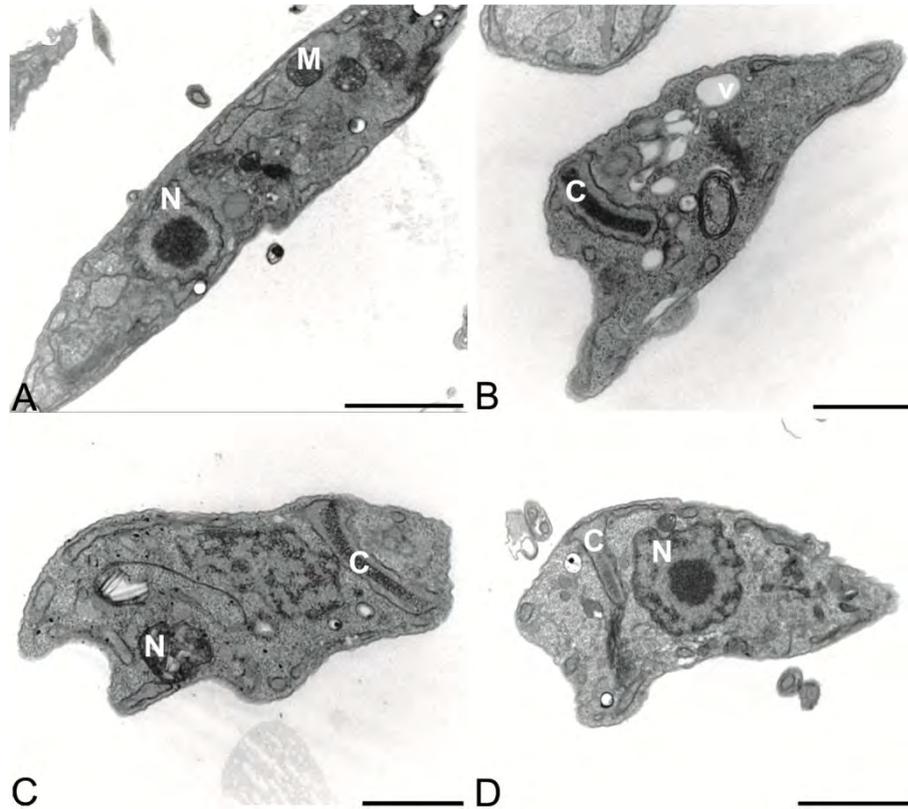
**Figura 12** - Microscopia óptica de epimastigotas tratados com diferentes extratos aquosos de espécies de *Palicourea*.



Legenda: A, E e I = controle. B, F e J = *Palicourea marcgravii*. C, G e K = *Palicourea rudgeoides*. D, H e L = *Palicourea tetraphylla*. Barras: 50  $\mu\text{m}$ .

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi visto que os epimastigotas não tratados apresentam uma aparência normal, membrana plasmática intacta com citoplasma e núcleo sem alterações (Fig. 12A). No entanto, o tratamento com os extratos aquosos a 100  $\mu\text{g/mL}$  causaram perda de conteúdo citoplasmático com a retração do corpo do parasito (Fig. 12B, C e D) e, descompactação da cromatina nuclear (Fig. 12C). Múltiplas vacuolizações citoplasmáticas (Fig. 12B) e alterações na membrana plasmática do parasito foram visualizadas (Fig. 12B, C a D).

**Figura 13** - Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados por 24 h com extratos aquosos a 100  $\mu\text{g/mL}$  de diferentes espécies de *Palicourea*.



Legenda: A: controle, B: *Palicourea marcgravii*, C: *Palicourea rudgeoides* and D: *Palicourea tetraphylla*. Mitocôndria (M), núcleo (N), vacúolo (V), cinetoplasto (C). Barras: A e D = 2  $\mu\text{m}$ , B e C = 1  $\mu\text{m}$ .

Também foram realizados ensaios de atividade antifúngica com os extratos de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* contra as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* e contra o fungo filamentosso *F. solani*. Todos os extratos foram testados numa concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , no entanto, não foi possível observar nenhum efeitos inibitório dos mesmos sobre os fungos testados (dados não mostrados).

#### 4.4 Discussão

Diversos extratos de folha das espécies *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* foram testados contra epimastigotas de *T. cruzi*. No entanto, nem todos os extratos tiveram efeitos dose/tempo dependentes, como observado pela retomada do crescimento dos parasitos após alguns tratamentos.

O EH<sub>2</sub>O foi o primeiro a ser testado por acreditar que é o extrato mais próximo da planta in natura. Porém, este extrato não foi mais eficiente que os outros, obtidos a partir de diversas extrações. O EBut foi o mais expressivo chegando a 100% de eliminação em 400 µg/mL de *P. marcgravii* e em 100, 200 e 400 µg/mL de *P. rudgeoides*. Em segundo ficou o EMeOH que inibiu 100% em 200 e 400 µg/mL de *P. rudgeoides* e em 400 µg/mL de *P. tetraphylla*. Seguida do EDCM que inibiu 100% em 400 µg/mL de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla*. E por fim inibição em 200 e 400 µg/mL de *P. rudgeoides* pelo EAcOEt. A atividade encontrada para os extratos metanólicos e em acetato de etila de *P. rudgeoides* pode estar relacionada às cumarinas que são as substâncias majoritárias encontradas nos mesmos. Alguns estudos descritos por Scio e colaboradores (2003) e Van Voorhis e colaboradores (2003) destacam a atividade de cumarinas contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

De acordo com a literatura, o uso de espécies da família Rubiaceae no tratamento contra protozoários vem se mostrando eficiente. Segundo Ali (2002), o extrato metanólico de *Gardenia lutea* Fresen. causou lise em 50% sob a forma tripomastigota dos parasitos em 22 µg mL<sup>-1</sup>, após 72 h de incubação. Hoet (2004) avaliou a estrutura de compostos já bem estabelecidos como antiprotozoários, como é o caso do quinino, um alcaloide de *Cinchona sp.* (Rubiaceae), a artemisinina, um sesquiterpeno lactona de *Artemisia annum* L. (Asteraceae) usado para tratar a malária e a emetina, um alcaloide de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. (Rubiaceae) utilizado para tratar a amebíase. O quinino apresentou atividade tripanocida significativa com IC<sub>50</sub> de 1,2 µM, em *T. brucei*, a artemisinina se mostrou inativa com IC<sub>50</sub> de 189 µM e a emetina teve ótimo resultado em IC<sub>50</sub> = 0.039 µM. A análise estrutural destes compostos têm sido utilizados para o desenvolvimento de outras drogas semi-sintéticas ou sintéticas com melhor eficácia e segurança (HOET et al. 2004). Cimanga e colaboradores (2006) mostraram que os extratos foliares etanólicos, diclorometano e éter de petróleo de *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae) tiveram atividade, *in vitro*, contra *Plasmodium falciparum*. Ogbunugafor e colaboradores (2007) observaram que o extrato butanólico de *M. ciliata* inibiu o crescimento de *T. bruce* em 68,68% quando administrado via oral por cinco dias em ratos. Kato et al. (2012) analisaram *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyem. e viu que o extrato bruto etanólico e os alcaloides tiveram ação tóxica sobre a forma epimastigota do *T. cruzi*. Contudo, trabalhos acerca da atividade antiprotozoa com espécies do gênero *Palicourea* são escassos na literatura. Nossos estudos utilizando os extratos foliares apresentaram potencial inibitório no crescimento e, por conseguinte, alterações na morfologia de *T. cruzi* epimastigota. No presente trabalho, a eliminação completa, quando ocorreu, foi a partir de 100 µg/mL nas três espécies, para os extratos, com exceção do hexânico, no tempo de 24 h.

No geral, o extrato butanólico das três espécies foi o que mais eliminou parasito, após 24 horas de incubação, sendo na espécie *P. rudgeoides* o resultado mais expressivo com eliminação completa.

Em relação à atividade antifúngica destes extratos, foi possível observar que nenhum dos extratos testados foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* e do fungo filamentosso *F. solani*, no entanto, resultados diferentes já foram vistos em outros trabalhos. Rodrigues e colaboradores (2014) relataram a atividade antifúngica dos extratos de várias espécies incluindo duas do gênero *Palicourea*. Os extratos aquoso e metanólico de *P. guianensis* e *P. corymbifera* foram ativos contra três cepas de *Candida sp.* Os autores correlacionaram a atividade destes extratos com a possível presença de alcaloides indol triterpeno, uma vez que estas substâncias são comumente encontradas em espécies da família Rubiaceae, cuja atividade antimicrobiana já foi demonstrada (FIGUEIREDO et al. 2009; NUNEZ et al. 2012). Entre as espécies de Rubiaceae, também observaram forte atividade contra *Candida sp* no extrato acetato de etila em *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich ex DC. (VALLI; YOUNG; BOLZANI 2016), em diferentes extratos de *Vangueria madagascariensis* J.F. Gmel. (RAMALINGUM; NELVANA; MAHOMOODALLY 2014) e de *Borreria laevicaulis* (Miq.) Ridl. (WONG et al. 2015). O fato dos extratos testados não terem tido efeito sobre o fungo e as leveduras, pode ser explicado, por exemplo, pela presença de parede celular nestes microrganismos, o que dificultaria a penetração dos extratos nas células.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que todos os extratos tiveram algum efeito sobre os parasitos e, dentre as três espécies analisadas, *P. rudgeoides* foi a que apresentou melhores resultados na redução dos epimastigotas com destaque para os extratos em butanol, metanol e acetato de etila.

## 5 ANÁLISE FITOQUÍMICA E QUIMIOSSISTEMÁTICA DE *PALICOUREA MARCGRAVII*, *P. RUDGEOIDES* E *P. TETRAPHYLLA*

### 5.1 Introdução

Entre as Rubiaceae, nem sempre os parâmetros morfológicos são suficientes para posicionar taxonomicamente as espécies em subfamílias e tribos (VALLI; YOUNG; BOLZANI 2016). Neste sentido, o perfil metabólico pode contribuir para um correto posicionamento taxonômico de suas espécies (TOMAZ; NOGUEIRA; SERA 2008), especialmente em gêneros de tribos diferentes, porém de grande semelhança morfológica como é o caso de *Palicourea* e *Psychotria*.

Estudos fitoquímicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de se conhecer e fornecer um perfil quimiotaxonômico para a família. A análise fitoquímica de folhas de *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel. resultou no isolamento de alcaloides, tendo como objetivo avaliar o mecanismo de ação farmacológica (CARBONEZI et al. 2004). A triagem química de espécies de *Heteropsychotria*, *Palicourea* e *Rudgea* cooperou para a análise sistemática, reafirmando o alcaloide como um marcador taxonômico importante (LOPES et al. 2004). A análise fitoquímica de *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. permitiu isolar e identificar cinco constituintes, contribuindo com o perfil quimiotaxonômico da família (TOMAZ; NOGUEIRA; SERA 2008). A prospecção fitoquímica da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl. revelou uma grande diversidade de metabólitos especiais como: triterpenos; cumarinas; alcaloides; heterosídeos antociânicos, saponínicos, cianogenéticos e taninos (DUARTE 2012). Os extratos etanólicos das folhas de dez espécies do gênero *Psychotria* foram avaliados quanto à atividade antibacteriana, em uma tentativa de encontrar novos agentes antituberculose, revelando uma contra *Mycobacterium bovis*, com a inibição da produção de óxido nítrico (MORAES et al. 2011).

As plantas são consideradas uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, sendo a biossíntese e o acúmulo de metabólitos especiais produzidos pela maioria das espécies superiores. Várias regiões do país, inclusive a Floresta Atlântica, são de interesse das indústrias farmacêuticas, cosméticas, alimentícias e agroquímicas (BALANDRIN et al. 1985; BATES 1985), para investigação de novas substâncias para a produção de formas terapêuticas tendo em vista a industrialização e o comércio de princípios ativos (SOUSA et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2007; ARAÚJO et al. 2008).

Os processos metabólicos podem ser divididos em dois conjuntos, o primário e o especial. Metabolismo primário corresponde a um conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, como por exemplo: a fotossíntese, a respiração e o

transporte de solutos, possuindo distribuição universal nas plantas, como os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e a clorofila (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN 1996).

As substâncias oriundas dos metabólitos especiais não são consideradas essenciais, porém garantem vantagem para a sobrevivência da planta (SIMÕES et al. 2004). Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas. No entanto, sua produção é associada à defesa da planta contra herbivoria, ataque de patógenos, radiação solar (MONTANARI JR 2002), ou ainda atuando na competição entre plantas e na atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes, microorganismos simbiotes e na alelopatia (SIMÕES et al. 2002). A síntese de metabólitos especiais pode ser afetada por diversos fatores ambientais, por representarem uma interface química entre as plantas e o ambiente (KUTCHAN 2001).

A quimiosistemática é a ciência que se baseia em dados químicos. E que por meio de índices químicos associados aos morfológicos permite avaliar questões taxonômicas e evolutivas das plantas, apresentando a distribuição e diversidade das micromoléculas. O tabelamento desses dados torna possível eleger marcadores quimiosistemáticos que são caracterizados pela ampla ocorrência e diversidade estrutural de diferentes classes químicas (GOTTLIEB et al. 1996). A seleção desses marcadores permite calcular parâmetros químicos como: o número de ocorrência (NO), parâmetro químico que fornece o grau de relevância de uma determinada categoria metabólica para o *taxon*. Outra maneira de expressar a frequência de distribuição de uma classe biossintética é o índice de diversidade (ID) (SILVA 1988). Esses são exemplos de parâmetros taxonômicos que permitem avaliar o grau de significância de uma substância para o *taxon* (SOARES 1996).

Avaliações anatômicas, fitoquímicas e quimiosistemática de substâncias derivadas de espécies vegetais têm tido um grande avanço nos últimos anos, no sentido de obter novas substâncias ativas. O estudo de critérios taxonômicos de natureza química, em especial os que se referem à química micromolecular, é um modo importante para complementar as informações necessárias aos taxonomistas (SANTOS et al. 2010).

Rubiaceae apresenta grande diversidade de metabólitos especiais, dentre os quais se destacam os alcaloides, pertencentes a mais de dez classes diferentes com destaque para os tipos quinolínicos, indoloterpênicos, isoquinolínicos, piridínicos e piperidínicos (SIMÕES et al., 2002). Além de iridoides (YOUNG et al. 1992; GALLEGOS; ROQUE 1997); triterpenoides (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG 1991; BROCHINI et al. 1994; OLEA; ROQUE 1997; YOUNG et al. 1998); flavonoides (OLEA; ROQUE 1997; PINTO et al. 2008); saponinas (YOUNG et al. 1998); quinonas (VERMES; WAGNER 1980). Também

foram evidenciados lignoides (KAMIYA; ZHANG; SIMA 2004); diterpenos (KOIKE et al. 1980); feofitinas (TOMAZ; NOGUEIRA; SERA 2008); esteroides (NAGASAMPAGI et al. 1971), cumarinas (BENEVIDES et al. 2004; PINTO et al. 2008), dentre outros.

Os alcaloides pirrolidinoindolínicos são substâncias resultantes da condensação de duas ou mais unidades de *N-b*-metil-triptamina, como por exemplo, a quimonanatina, hodkinsina e psicotridina (MOURA; MARUO 2014). Esse tipo compreende mais de 400 estruturas diferentes (HARTAMANN; ODER 2008). Os alcaloides indólicos geralmente estão relacionados com o metabolismo do triptofano e apresentam substituições em diferentes posições do anel indólico (WILLIAMS 2001). Os alcaloides indólicos monoterpênicos são considerados um excelente marcador quimiotaxonômico dentro de Angiospermas, por permitir o posicionamento de Rubiaceae em Gentianales, próximo à Apocynaceae e Loganiaceae e estabelecer afinidades quimiotaxonômicas entre estas (YOUNG et al. 1996). A principal característica dos alcaloides indólicos monoterpênicos é sua origem biossintética comum. Todas as substâncias conhecidas provêm de um precursor único: a strictosidina produzida pela condensação de uma molécula de triptamina com um alcaloide terpênico, o secologanosídeo, elaborado via geraniol, a partir das moléculas do ácido mevalônico (BRUNETON 1991). Na via biossintética do alcaloide indólico-monoterpênico, a enzima triptofano descarboxilase converte triptofano em triptamina (LOPEZ-MEYER; NESSLER 1997; ZIEGLER; FACCHINI 2008). Iridóides são substâncias monoterpenoídicas tendo a estrutura química baseada no esqueleto ciclopentano- [C]- pirano, iridoides carbocíclicos e a clivagem oxidativa da ligação 7,8 do anel ciclopentano fornece os chamados secoiridoides (SAMPAIO-SANTOS; KAPLAN, 2001). Segundo SAMPAIO-SANTOS; KAPLAN (2001) pode existir duas vias para a biossíntese de iridoides: uma envolvendo o iridodial como precursor e a outra tendo o 8-epi-iridodial como intermediário chave. O uso de iridoides marcados, a fim de estabelecer passos da via biossintética, foi documentado para espécies da família Rubiaceae (UESATO et al. 1984; 1986; INOUE et al. 1988; JENSEN 1991).

A presença de iridoides em Rubiaceae é de grande relevância devido ao fato de serem marcadores taxonômicos. A loganina é precursora de secologanina, uma das substâncias formadoras dos alcaloides indólicos monoterpênicos e de alguns alcaloides isoquinolínicos (BRUNETON 1993). Alcaloides quinolínicos são formados a partir da condensação de duas unidades *N-b*-metiltriptamina, como por exemplo, a emetina e a cefaelina (ADJIBADÉ et al. 1992; VERROTA et al. 1998; MOURA; MARUO 2014). Flavonoides são caracterizados estruturalmente por possuírem dois anéis aromáticos hidroxilados, A e B, unidos por um terceiro anel, C heterocíclico (DI CARLO et al. 1999; ENDT et al. 2002). Sua distribuição

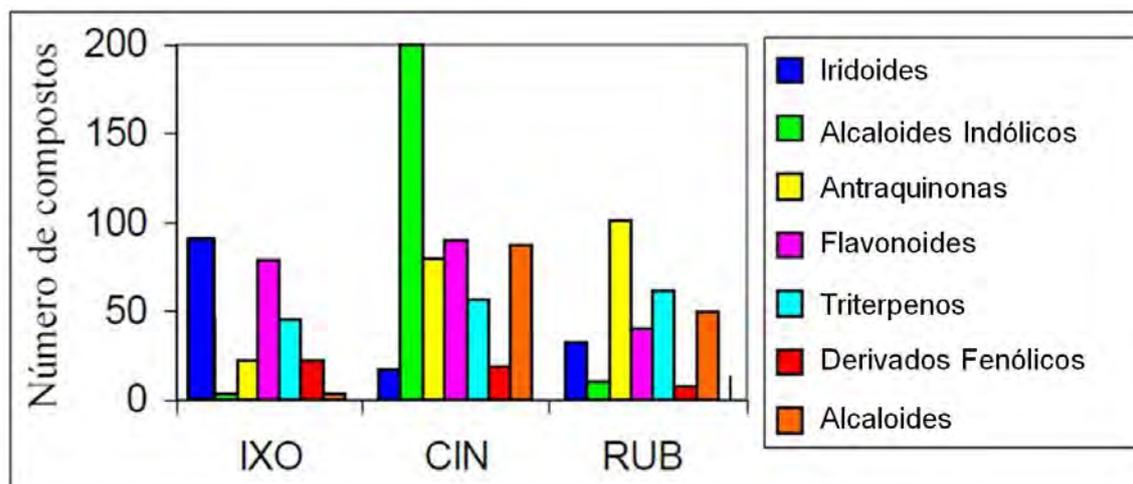
normalmente é uma ferramenta auxiliar na classificação, e são, portanto, largamente utilizados como marcadores quimiosistemáticos por causa da sua larga distribuição em plantas superiores e da enorme diversidade de tipos estruturais que apresenta (HARBORNE 1984; BARREIROS 1990).

As cumarinas são amplamente distribuídas entre as plantas, ocorrendo predominantemente em Angiospermas. O interesse farmacêutico por essas substâncias se deve ao fato de mostrarem atividades farmacológicas relevantes, tais como imunossupressora, hipolipidêmica, hipotensora, relaxante vascular e muscular (SIMÕES 2007). Cumarinas simples são biogeneticamente derivadas de ácido chiquímico, através do ácido cinâmico. A diversificação desses metabolitos envolvendo a biossíntese de estruturas mais complexas fica restrita a algumas famílias. Cumarinas com esqueleto mais simples são de ampla ocorrência como umbeliferona (7-hidroxycumarina), esculetina (6,7-dihidroxycumarina), escopoletina (7-hidroxi-6 - metoxi cumarina) (SHIMIZU et al. 2005).

As antraquinonas são relatadas para Rubiaceae por apresentarem quantidades consideráveis, especialmente nas raízes (HAN; VAN DER HEIJDEN; VERPOORTE 2001). A literatura relata duas principais vias biossintéticas: via do policetídeo e via do ácido corismato/O-succinilbenzoico. Na família, as antraquinonas são consideradas do tipo *Rubia*, isto é, o anel A e B são biossinteticamente derivados do ácido corísmico e do  $\alpha$ -cetoglutarato via ácido *o*-succinilbenzoico, enquanto que o anel C é formado a partir de isopentenil difosfato através da via do terpenoide (LEISTNER 1981, 1985).

Estudos indicam a tendência de um perfil químico para cada subfamília, que podem ser considerados marcadores taxonômicos para Rubiaceae (Figura 13). Na subfamília Ixoroideae, os iridoídeos são considerados como os marcadores quimiotaxônomicos, enquanto em Cinchonoideae, predominam os alcalóides indólicos e em Rubioideae, antraquinonas representam a principal classe de metabólitos secundários (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG 1991; TREVISAN 1993; YOUNG et al. 1996).

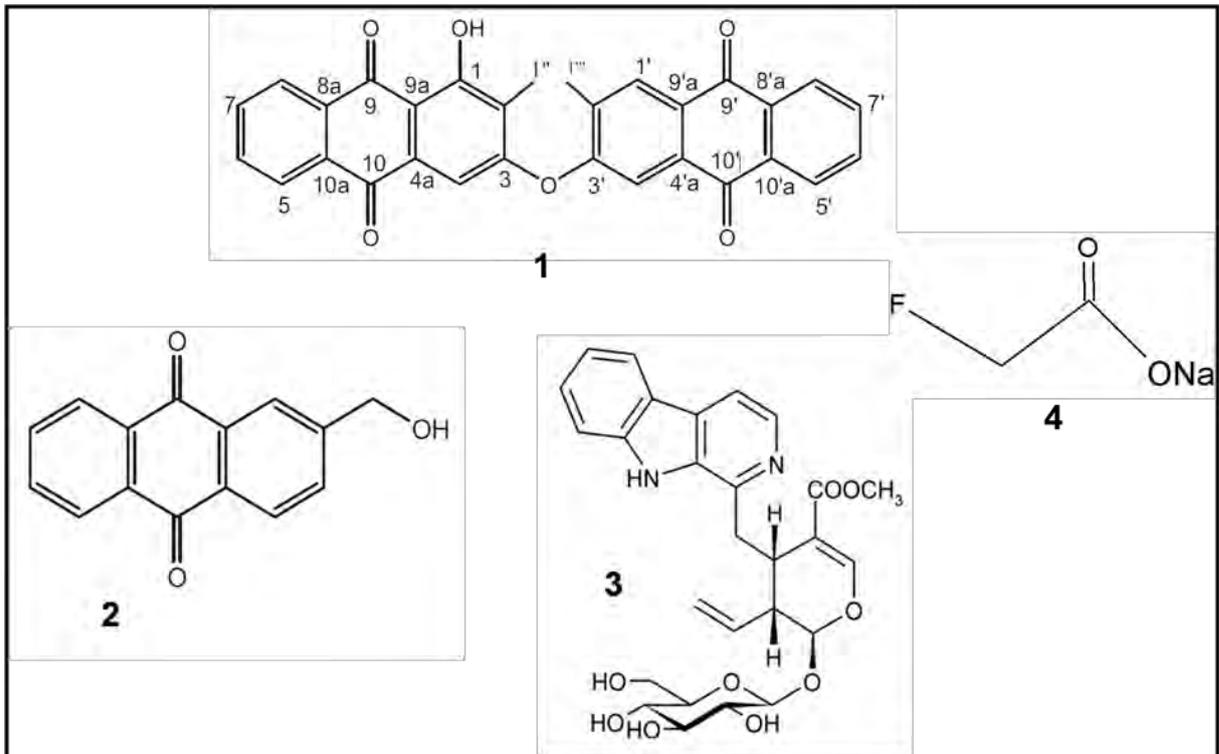
**Figura 14** - Diversidade química e distribuição dos principais constituintes nas três subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN) e Rubioideae (RUB).



Legenda: Fonte (Adaptado de BOLZANI et al. 2001).

Donfack e colaboradores (2014) isolaram duas antraquinonas schimperiquinona A (Fig. 14 (1)) e 2-hidroxi metil-antraquinona (Fig. 14 (2)) de *Pentas schimperi* (Hochst.) Wieringa (Rubioideae) e testaram contra células tumorais obtendo resultados positivos. O tipo 2-hidroxi-3- metil-antraquinona foi isolado de *Palicourea coreacea* (DA SILVA; DE CARVALHO; ALVES 2008), que apesar de ser considerada a classe química mais encontrada em Rubioideae, outras classes se destacam em *Palicourea*. Lopes (2004), em estudos com *Palicourea rigida* Kunth. inferiu como a presença de alcaloide pode ser significativa como marcador químico. O lialosideo (Fig. 14 (3)), por exemplo, é um alcaloide monoterpênico glucoindólico isolado de extratos foliares de *Palicourea adusta* Standl. (VALVERDE; TAMAYO; HESSE 1999). Uma substância bastante encontrada em *Palicourea* é o monofluoroacetato (Fig. 14 (4)) ou ácido monofluoroacético. Silva e colaboradores (2011) usaram extrato foliar em acetato de etila de *Palicourea marcgravii* contendo 0,12% de monofluoroacetato contra um tipo de carrapato e obteve bons resultados. Coelho e colaboradores (2007) também observaram a presença de ácido monofluoroacético em folhas de *Palicourea longiflora* (Aubl.) A. Rich. Lee e colaboradores (2012) identificaram monofluoroacetato em *Palicourea aeneofusca* (Müll. Arg.) Standl.

**Figura 15** – Exemplo de estruturas de substâncias que já foram isoladas no gênero *Palicourea*.



Legenda: (1) schimperiquinona, (2) 2-hidroximetilatraquinona, (3) lialosideo e (4) monofluoroacetato.

O monofluoroacetato (MFA) é uma substância proibida no Brasil devido ao risco de intoxicação e considerada como o princípio tóxico das chamadas plantas brasileiras que causam morte súbita (NOGUEIRA; PEIXOTO; FRANÇA 2011). Dentre estas está *Palicourea marcgravii* (TOKARNIA et al. 1993). O modo de ação do MFA baseia-se na formação do fluorocitrato, formado no organismo quando o fluoroacetato se liga à acetil Coenzima A (CoA) para formar fluoroacetil CoA, que substitui o acetil CoA no ciclo energético de Krebs e reage com citrato sintase, produzindo fluorocitrato. Este composto bloqueia competitivamente outras enzimas interferindo na cadeia respiratória e consequentemente nos processos metabólicos dependentes de energia. Gera acúmulo de citrato em vários tecidos (CLARKE 1991), diminui a oxidação do acetato, diminui o uso do piruvato na incorporação de CO<sub>2</sub> (NOVÁK et al. 1972) assim como aumenta o nível de cálcio (COLLICCHIO-ZUANAZE et al. 2006).

O estudo de critérios taxonômicos de natureza química, em especial os que se referem à química micromolecular, é importante para complementar as informações necessárias aos taxonomistas (SANTOS et al. 2010). Problemas taxonômicos relativos à classificação de

espécies do gênero *Palicourea* têm conduzido a investigações em outras áreas de conhecimento como o da química micromolecular, que possibilita compreender a distribuição, diversidade e tendência evolutiva dos metabólitos especiais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar substâncias em três espécies simpátricas de *Palicourea* e estabelecer um paralelo entre as micromoléculas observadas nos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, a fim de contribuir com a taxonomia da família Rubiaceae em táxons de grande semelhança morfológica.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Fitoquímica**

#### **Obtenção do extrato metanólico (EMeOH)**

O material vegetal utilizado na obtenção do extrato metanólico foi coletado no Parque Nacional do Itatiaia-RJ, as espécies foram encontradas na borda das trilhas, *P. marcgravii* e *P. rudgeoides* estavam pouco expostas ao sol sendo encobertas por arbustos mais altos ao redor, já *P. tetraphylla* estava completamente exposta ao sol. As folhas completamente expandidas dessas três espécies foram secas em temperatura ambiente e à sombra durante quinze dias. Posteriormente, as folhas foram pulverizadas em moinhos de facas com granulação definida resultando em 25,08 g; 32,50 g e 496,36 g respectivamente. O pó de folhas foi acondicionado em potes de vidro, sendo em seguida, adicionados 150 ml de metanol no vidro com o pó das folhas de *P. marcgravii* e *P. rudgeoides* e 1.000 ml no vidro com o pó das folhas de *P. tetraphylla*. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por treze dias. Após este período o extrato metanólico foi filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotatório sob 60° C, 80 rpm e baixa pressão. A cada quatro dias o macerado foi filtrado e mais 150/150/1000 ml de metanol adicionado ao vidro de cada espécie. Após o macerado ser filtrado, o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório, os rendimentos dos extratos metanólicos foram de 2,78 g para *P. marcgravii*; 5,66 g para *P. rudgeoides* e 69,74 g para *P. tetraphylla*.

#### **Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A cromatografia em camada delgada foi empregada com o objetivo de acompanhar a purificação das frações obtidas no processamento dos extratos. As cromatoplasmas de sílica de alumínio, 250 UM, 20 x 20 cm, F 254 fabricante Silicycle® foram cortadas em placas cromatográficas menores (2,5 cm por 5 cm), os extratos obtidos aplicados a 0,5 cm da base e

eluídos em diferentes sistemas de solventes (Tab. 7) de modo a avaliar o melhor sistema para separação dos constituintes das futuras frações e desenvolver os perfis cromatográficos. Os reveladores utilizados para a visualização dos compostos foram luz ultravioleta em 254 e 366 nm (método físico), com auxílio de lâmpada de luz ultravioleta Modelo CM-10 (Spectroline®). As placas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica 1:1 seguido de aquecimento (método químico). Além de algumas placas serem aspergidas com Dragendorff (YODER; MAHLBERG 1976), reagente de Nadi (DAVID; CARDE 1964) Vanilina clorídrica (MACE; HOWELL 1974) e cloreto de alumínio (CHARRIÈRE- LADREIX 1976).

**Tabela 7:** Quadro com os sistemas de eluentes e reveladores testados para as três espécies.

<b>Extratos</b>	<b>Eluentes</b>	<b>Reveladores</b>
EMeOH	clorofórmio / acetona (7:3)	Dragendorff, Reagente de Nadi e Vanilina clorídrica
	clorofórmio / metanol (9:1); metanol / clorofórmio (9:1); clorofórmio / acetona (7:3); clorofórmio / acetona (3:7) (7:3); clorofórmio / acetato de etila (7:3) (1:1); hexano / acetato de etila (7:3)	Vanilina sulfúrica
EHEX	hexano / clorofórmio (7:3), (1:1), (3:7); hexano / acetato de etila (1:1), (7:3), (3:7); clorofórmio / acetato de etila (7:3)	Vanilina sulfúrica
EAcOEt	acetato de etila / acetona (1:1), (7:3), (3:7); acetato / metanol (3:7); clorofórmio / metanol (9:1); hexano / acetato de etila (7:3)	Vanilina sulfúrica
ECHCl <sub>2</sub>	hexano / acetato de etila (8:2); hexano / acetato de etila (6:4)	Vanilina sulfúrica

Legenda: Extrato em metanol (EMeOH), Extrato em hexano (EHEX), Extrato em acetato de etila(EAcOEt), Extrato em diclorometano (ECHCl<sub>2</sub>).

### **Cromatografia com fase líquida em colunas abertas (CC)**

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada em colunas de vidro aberta empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech®) utilizando MeOH como fase móvel. E também coluna empacotada com sílica gel. As frações foram coletadas em frascos de vidro de 15 ml.

### **Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II (500/125 MHz), utilizando-se clorofórmio, metanol ou piridina deuteradas como solventes e tetrametilsilano (TMS) como referência. Foram obtidos experimentos especiais para definição das estruturas como DEPT  $^{13}\text{C}$ , DQF-COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HMBC e NOEdiff. Os deslocamentos químicos foram medidos em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento ( $J$ ) medidas em Hertz (Hz).

### **Critérios de Pureza**

O critério de pureza adotado foi a observação de mancha única em cromatografia em camada delgada, com a utilização de diferentes sistemas de eluentes. As frações foram reunidas de acordo com sua semelhança cromatográfica após a observação da CCD.

### **Fracionamento do extrato metanólico de folhas de *P. marcgravii* e *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla***

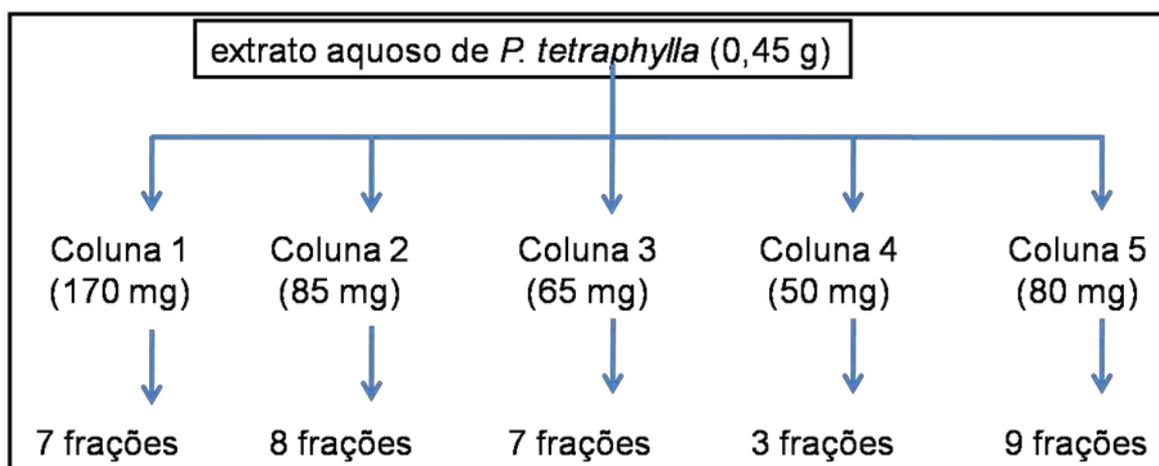
O fracionamento foi o mesmo realizado para os testes antifúngicos e antiparasitário esquematizados na figura 11. A partição líquido-líquido, entre água e solventes de polaridade crescente, consistiu na separação dos componentes do extrato bruto metanólico. A partição é baseada nos coeficientes de separação entre dois solventes imiscíveis, sendo utilizada para tornar as misturas de substâncias químicas presente no extrato mais simples, de acordo com a polaridade. Os solventes utilizados para a partição foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, álcool butílico e água. Foram usados cerca de 2 g, 3 g e 4 g dos extratos metanólicos de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla*, respectivamente, diluídos em 500 ml de água destilada e em solventes de polaridade crescente, fracionado por meio de funil de separação, gerando novos extratos. Os novos extratos obtidos com o fracionamento foram concentrados em evaporador rotatório e pesados, os pesos obtidos para os demais extratos provenientes do fracionamento podem ser encontrados na tabela 8.

Destes extratos foram feitas várias placas cromatográficas usando diferentes eluentes e reveladores a fim de fazer uma prospecção fitoquímica e comparar com os resultados dos testes histoquímicos. Como são extratos e não substâncias isoladas os resultados podem se tratar de um falso positivo ou negativo. Os resultados da prospecção estão nas tabelas 9, 10 e 11.

### **Fracionamento do extrato aquoso de folhas de *P. tetraphylla***

A separação cromatográfica foi feita a partir do extrato aquoso de *P. tetraphylla* (0,45 g). A escolha de começar por este extrato foi devido ser a espécie com maior quantidade de extrato bruto metanólico. Na primeira coluna foram aplicados cerca de 170 mg do extrato. Esse processo foi repetido por mais quatro vezes, até o término do extrato (Fig. 16).

**Figura 16** – Diagrama do fracionamento do extrato aquoso de *P. tetraphylla*



Legenda: Cinco colunas provenientes do extrato aquoso de *P. tetraphylla*.

As frações, do extrato aquoso de *P. tetraphylla*, foram recolhidas de acordo com as diferentes colorações que foram apresentadas na coluna e monitoradas por CCD (Fig. 17). De acordo com os resultados do monitoramento com CCD, as frações foram reunidas e enviadas para análise em RMN. A quantidade de material constituintes das frações não foi suficiente para a obtenção de espectros com resolução adequada para identificação de metabólitos, podendo, entretanto, propor a presença dos mesmos.

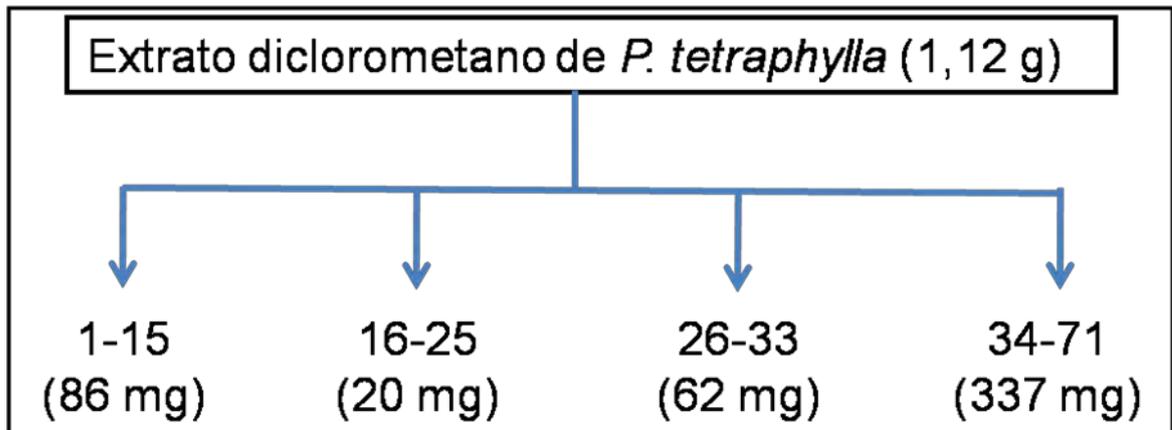
**Figura 17** – Frações da coluna do extrato aquoso de *P. tetraphylla*.



Legenda: Seis das sete frações recolhidas em frascos de 8 ml da primeira coluna do extrato aquoso de *P. tetraphylla*.

O extrato em diclorometano de *P. tetraphylla* (1,12 g) foi dissolvido em metanol e incorporado a duas partes de sílica-gel para cada parte de amostra, utilizando constante homogeneização em cápsula de porcelana, promovendo a evaporação do solvente, até a formação da pastilha, sendo submetida à cromatografia líquida em coluna de sílica gel. Como fase móvel, iniciou-se com 5 % de acetato de etila para 95 % de hexano num volume de 100 mL, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 80% de acetato de etila. Foram coletadas 71 frações em frascos de vidro de aproximadamente 8 mL. Nas cromatoplas, o sistema de eluentes utilizado foi 2 ml de hexano para 3-5 gotas de acetato de etila, assim foi possível reunir as frações de 1-15, 16-25, 26-33, 34-71 (Fig. 18). Da fração 16-25 isolou-se a substância (1) e da fração 26-33 a substância (2).

**Figura 18:** Diagrama do fracionamento do extrato em diclorometano de *P. tetraphylla*.



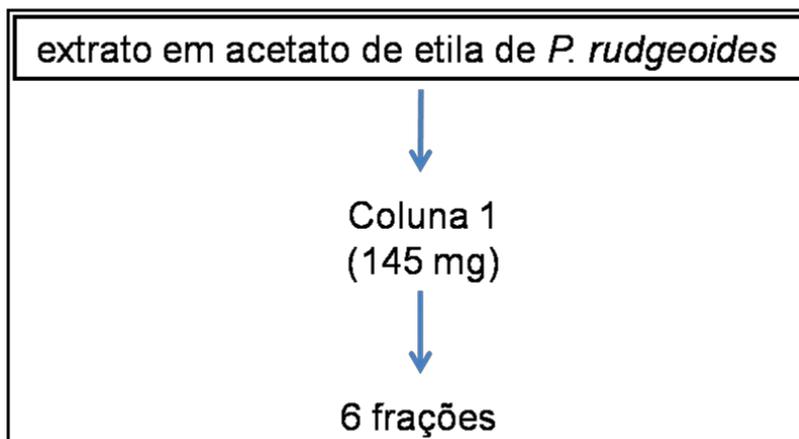
Legenda: Rendimento das 71 frações obtidas e reunidas.

#### **Fracionamento do extrato metanólico e acetato de etila de folhas de *P. rudgeoides***

Os frascos com o extrato metanólico e o extrato em acetato de etila de *P. rudgeoides* apresentaram um precipitado branco na parede lateral do frasco. Este material foi separado da parte que ficou no fundo do frasco e pesado. O precipitado do extrato em acetato de etila (0,0565g -3) dissolveu em acetona e o precipitado do extrato metanólico (0,0522g - 4), dissolveu em piridina e ambos foram enviados para análise em RMN.

A parte que ficou no fundo do frasco (0,1454g) do extrato em acetato de etila de *P. rudgeoides*, foi aplicada em coluna (2,5 por 37 cm) de sephadex usando como eluente o metanol e foram recolhidas em 6 frações. A placa cromatográfica foi eluída em acetato de etila/acetona (3:7) e observada sob luz UV (Fig. 19).

**Figura 19** – Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de *P. rudgeoides*.

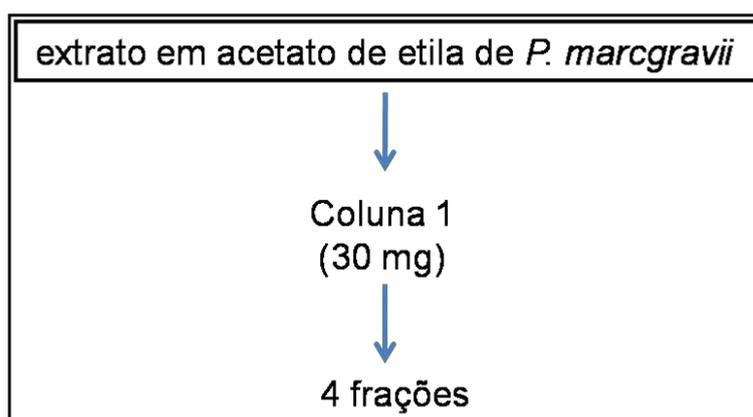


Legenda: Rendimento de seis frações derivadas da coluna com extrato em acetato de etila.

#### **Fracionamento do extrato metanólico e acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* e *P. tetraphylla***

Do extrato em acetato de etila de *P. marcgravii*, foi fracionado (30 mg) em coluna de sephadex (1,5 por 34 cm) e foram obtidos 4 frações (Fig. 20). A terceira fração desta coluna contendo 12 mg, foi novamente aplicada em coluna de sephadex (1,5 por 37 cm) tendo como eluentes metanol/diclorometano (4:1). Foram obtidas três novas frações. Porém, a quantidade de material isolado não foi suficiente para proceder à elucidação estrutural.

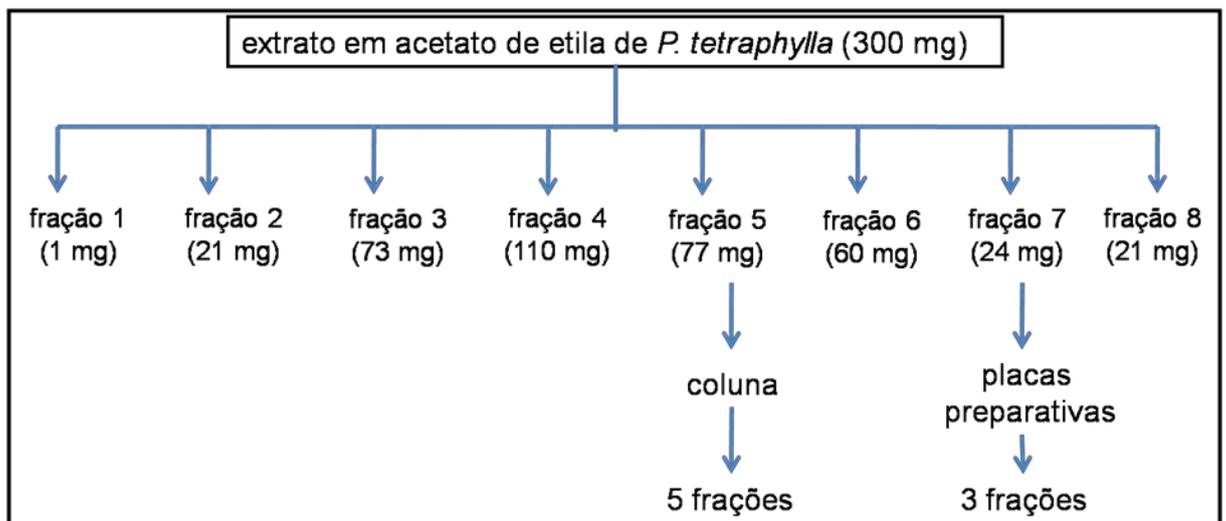
**Figura 20** – Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de *P. marcgravii*.



Legenda: Rendimento de quatro frações derivadas da coluna com extrato em acetato de etila.

A separação cromatográfica do extrato em acetato de etila de *P. tetraphylla* (300 mg) foi feita em coluna de sephadex (2,5 por 44 cm). Renderam oito frações (Fig. 21). A fração cinco (77 mg) foi aplicada em coluna (1,5 por 37 cm) com metanol/diclorometano (4:1). Desta fração, cinco novas frações foram produzidas e a fração três (6 mg) foi para RMN. Com a fração sete (24 mg) foram feitas placas preparativas.

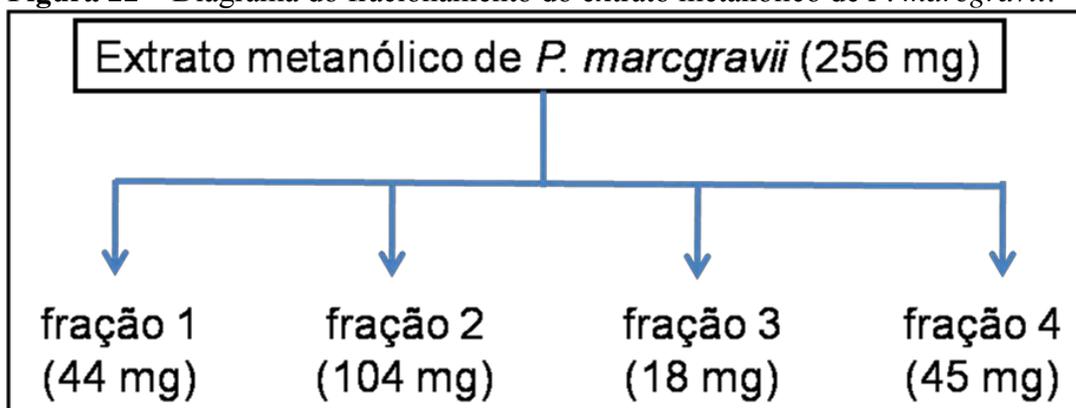
**Figura 21** – Diagrama do fracionamento do extrato em acetato de etila de *P. tetraphylla*.



Legenda: Rendimento de oito frações derivadas da coluna com extrato em acetato de etila e novas frações advindas das frações cinco e sete.

A separação cromatográfica do extrato metanólico de *P. marcgravii* (256 mg) foi feita em coluna de sephadex (2,5 por 44 cm). Renderam 4 frações (Fig. 22). A fração 3 (18 mg) foi enviado para RMN.

**Figura 22** – Diagrama do fracionamento do extrato metanólico de *P. marcgravii*.



Legenda: Rendimento de quatro frações derivadas da coluna com extrato metanólico.

### Quimiosistemática

Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico sobre os constituintes químicos de espécies dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, por serem considerados gêneros bem próximos, de trabalhos publicados nos sites ScienceDirect e CAS SciFinder, a partir de 1990 até 2015. Seguido de um tabelamento que serviu de base para o estabelecimento do perfil fitoquímico e determinação dos índices químicos. Posteriormente, foram complementadas as informações com a consulta aos artigos originais, de revisão e às obras especializadas. O sistema de classificação botânico utilizado foi o APG III (2009).

A partir, foi calculado o número de ocorrência (NO) das substâncias de uma mesma classe para cada gênero, o índice de diversidade (ID) que foi obtido do produto do número de ocorrência (NO) pelo número de tipos (NT) estruturais de classes químicas, dividido pelo número de espécies estudadas. A quantificação dos parâmetros referentes à substituição de cada representante flavonoídico (BARREIROS, 1990) foi calculado através da divisão pelo número total de grupos oxílicos, do número de grupos O-glicosila (IG, Índice de Glicosilação), do número de grupos O-metila (IM, Índice de Metilação), da soma dos grupos O-glicosila e O-metila (IP, Índice de Proteção Total) e do número de hidroxilas livres (ID, Índice de Desproteção).

### 5.3 Resultados

A partir dos extratos metanólicos de *P. marcgravii* (2,78 g); *P. rudgeoides* (5,66 g) e *P. tetraphylla* (69,74 g), foram feitos os fracionamentos e os pesos obtidos para os extratos estão na tabela 8:

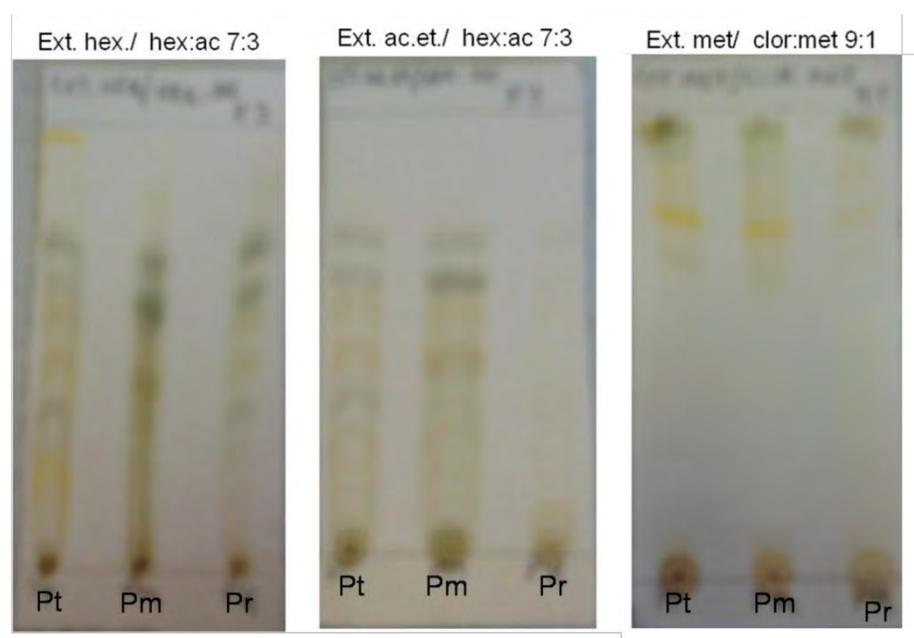
**Tabela 8:** Rendimento do fracionamento dos extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água.

Extrato metanólico	EHEX	ECHCl <sub>2</sub>	EAcOEt	EBUT	EH <sub>2</sub> O
<i>P. marcgravii</i>	0,33g	0,06g	0,64g	0,03g	0,5g
<i>P. rudgeoides</i>	0,17g	0,04g	0,89g	-	-
<i>P. tetraphylla</i>	0,5g	0,05g	0,03g	0,19g	0,45g

Legenda: EHEX- extrato hexânico, E CHCl<sub>2</sub>- extrato diclorometano, EAcOEt- extrato acetato de etila, EBUT- extrato butanólico e EH<sub>2</sub>O- extrato aquoso. Os extratos butanólico e aquoso de *P. rudgeoides* foram descartados devido a proliferação de fungos.

Os sistemas de eluentes testado para cada um dos extratos pode ser evidenciado na tabela 9. O melhor sistema de eluentes para os extratos hexânico, diclorometano e acetato de etila foi hexano/acetato de etila (7:3) (Fig. 23). Para o extrato metanólico os melhores sistemas de eluentes foram hexano/acetato de etila (7:3) e clorofórmio/metanol (9:1) (Fig. 23). A figura 23 apresenta as placas não reveladas; ou seja, sem ação de reagentes. As placas cromatográficas aspergidas com Dragendorff apresentaram resultado negativo para todos os extratos, assim como nos testes histoquímicos (seção 3).

**Figura 23** - Placas cromatográficas com extratos em hexano, acetato de etila e metanol.



Legenda: (Ext. hex.)- Extrato hexânico em eluentes hexano/acetato de etila (7:3), (Ext. ac.et)- Extrato acetato em eluentes hexano/acetato de etila (7:3). (Ext.met)- Extrato metanólico em eluentes clorofórmio/metanol (9:1).

Os testes com os diferentes reveladores indicaram alguns possíveis grupos de metabólitos presentes nos extratos. O resultado da prospecção fitoquímica realizada com os extratos: hexânico (EHex), metanólico (EMeOH), diclorometano (ECHCl<sub>2</sub>) e acetato de etila (EAcOEt) está indicado nas tabelas 9, 10 e 11.

Quando a placa cromatográfica com o extrato hexânico de *P. marcgravii* (Tabela 9), eluída com hexano / acetato de etila (7:3), foi aspergida com cloreto de alumínio e observada sob luz UV, ficou evidenciada a presença de uma banda amarela que passou para marrom indicando a possível presença de flavonoide. Na placa com o extrato em acetato de etila (hexano/acetato de etila - 7:3) aspergida com cloreto de alumínio e observada sob luz UV foi possível observar uma banda lilás bem próximo a base (Fig. 24), também indicando a possível presença de flavonoide. O reagente de Nadi revelou substâncias do extrato hexânico (hexano/acetato de etila - 7:3). As bandas que eram amarelas ficaram arroxeadas o que indica possível presença de terpenoide (Fig. 24). O reagente de Nadi também revelou substâncias do extrato de acetato de etila (clorofórmio/acetato de etila - 1:1).

**Tabela 9:** Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de *P. marcgravii*.

Metabólitos/Reagentes/Autor	Resultados/Extratos			
	EHex	EMeOH	ECHCl <sub>2</sub>	EAcOEt
<b>Alcaloides</b> (reagente de Dragendorff (Svendsen; Verpoorte 1983))	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b> (cloreto de alumínio (Wagner; Bladt 2001))	+	-	-	+
<b>Terpenoides</b> (reagente de Nadi (David; Carde 1964))	+	-	-	+
<b>Taninos</b> (vanilina clorídrica (Roberts et al. 1957))	+	-	+	+

Legenda: Resultado negativo (-). Resultado positivo (+). EHex- extrato hexânico, EMeOH- extrato metanólico, ECHCl<sub>2</sub>- extrato diclorometano e EAcOEt- extrato acetato de etila.

**Figura 24** - Esquema da placa cromatográfica com extrato acetato de etila em eluentes

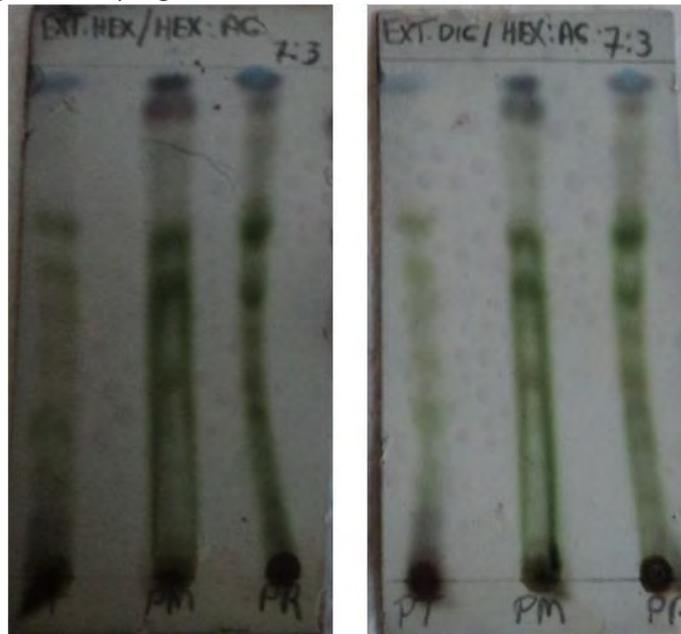
hexano/acetato de etila (7:3) e aspergidas com reagente de Nadi.



Legenda: extrato acetato de etila (Ex. ac.et.), banda roxa azulada indicando possível presença de flavonoide.

Já com vanilina sulfúrica, os extratos hexânico e diclorometano de *P. marcgravii* (hexano/acetato de etila - 7:3) apresentaram uma coloração roxa azulada, indicando possível presença de terpenos (Fig. 25).

**Figura 25** - Placas cromatográficas aspergidas com vanilina sulfúrica.



Legenda: Extrato hexânico (Ext.Hex), extrato diclorometano (Ext. Dic) em eluentes hexano/acetato de etila (7:3). *Palicourea tetraphylla* (Pt), *Palicourea marcgravii* (Pm) e *Palicourea rudgeoides* (Pr).

Quando a placa cromatográfica com o extrato metanólico e acetato de etila de *P. rudgeoides* (Tabela 10), eluídas em hexano/acetato de etila (7:3), foram aspergidas com cloreto de alumínio e observadas sob luz UV curta, surgiu uma banda lilás bem próximo a base da placa, indicando a possível presença de flavonoide (dado não mostrado). O mesmo foi observado para as placas com extratos metanólicos, diclorometano e acetato de etila eluídas em clorofórmio/acetona (7:3), com a placa com extrato metanólico eluída em clorofórmio/metanol (9:1) e com as placas com extrato metanólico e acetato de etila eluídas em clorofórmio/acetato de etila (1:1).

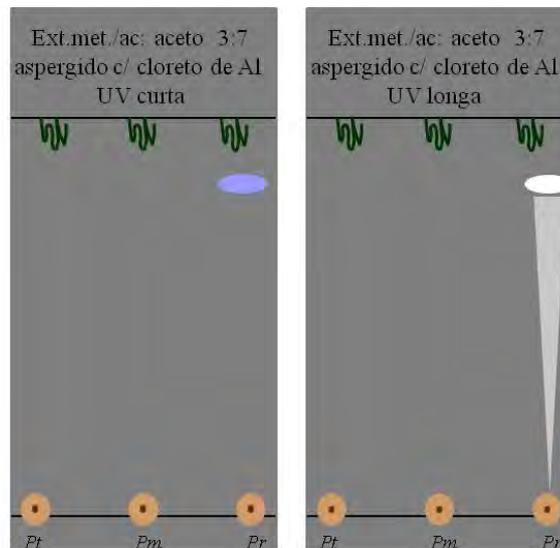
As placas com extratos metanólicos, diclorometano e acetato de etila eluídas em acetato de etila/acetona (3:7) aspergidas com cloreto de alumínio e observada sob luz UV curta mostraram uma banda lilás mais ao topo da placa e quando observadas em luz UV longa essa banda ficou branca (Fig. 26).

O reagente de Nadi revelou na placa do extrato hexânico eluída em hexano/acetato de etila (7:3). Com vanilina clorídrica, os extratos hexânico, diclorometano e acetato de etila eluídos em hexano/acetato de etila (7:3) apresentaram resposta negativa.

**Tabela 10:** Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de *P. rudgeoides*.

Metabólitos/Reagentes	Resultados/Extratos			
	EHex	EMeOH	ECHCl <sub>2</sub>	EAcOEt
<b>Alcaloides</b> (reagente de Dragendorff)	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b> (cloreto de alumínio)	-	+	+	+
<b>Terpenoides</b> (reagente de Nadi)	+	-	-	+
<b>Taninos</b> (vanilina clorídrica)	-	-	-	-

Legenda: Resultado negativo (-). Resultado positivo (+). EHex- extrato hexânico, EMeOH- extrato metanólico, ECHCl<sub>2</sub>- extrato diclorometano e EAcOEt- extrato acetato de etila.

**Figura 26** - Esquema das placas cromatográficas com extrato metanólico em eluentes acetato de etila/acetona (3:7) e aspergidas com cloreto de alumínio.

Legenda: (Ext. met.)- extrato metanólico. Banda roxa azulada em UV curta e banda branca em UV longa indicando possível presença de flavonoide em *Palicourea rudgeoides*.

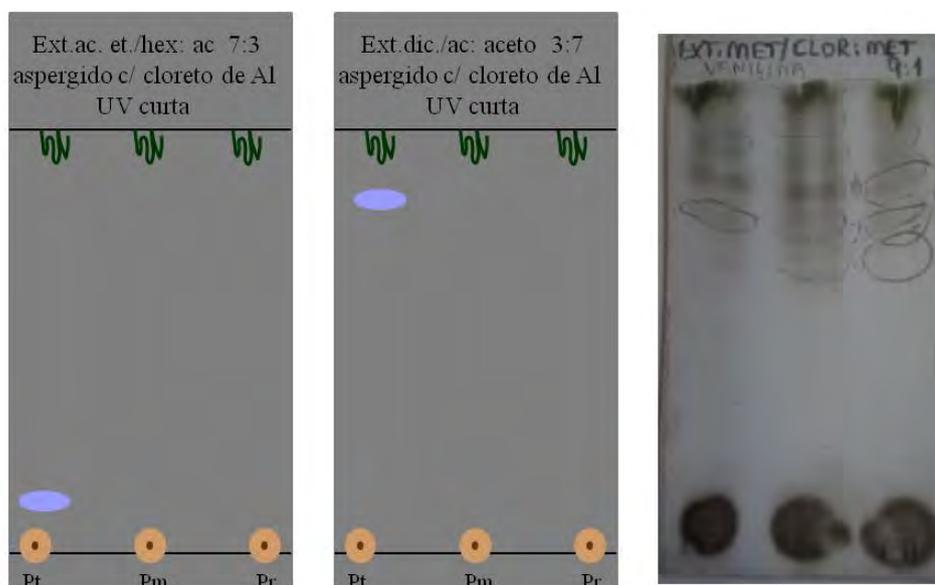
Quando a placa cromatográfica com o extrato acetato de etila de *P. tetraphylla* (Tabela 11), eluída em hexano/acetato de etila (7:3) foi aspergida com cloreto de alumínio e observada em luz UV curta surgiram bandas lilás, que indicam a possível presença de flavonoides (WAGNER; BLADT 2001) (Fig. 27). O mesmo ocorreu na placa com o extrato em diclorometano eluída em acetato de etila/acetona (3:7) e com as placas dos extratos diclorometano e acetato de etila eluídas em clorofórmio/metanol (9:1). Os testes com reagente de Nadi e vanilina clorídrica deram negativos.

**Tabela 11:** Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de *P. tetraphylla*.

Metabólitos/Reagentes	Resultados/Extratos			
	EHex	EMeOH	ECHCl <sub>2</sub>	EAcOEt
<b>Alcaloides</b> (reagente de Dragendorff)	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b> (cloreto de alumínio)	-	-	+	+
<b>Terpenoides</b> (reagente de Nadi)	-	-	-	-
<b>Taninos</b> (vanilina clorídrica)	-	-	-	-

Legenda: Resultado negativo (-). Resultado positivo (+). EHex- extrato hexânico, EMeOH- extrato metanólico, ECHCl<sub>2</sub>- extrato diclorometano e EAcOEt- extrato acetato de etila.

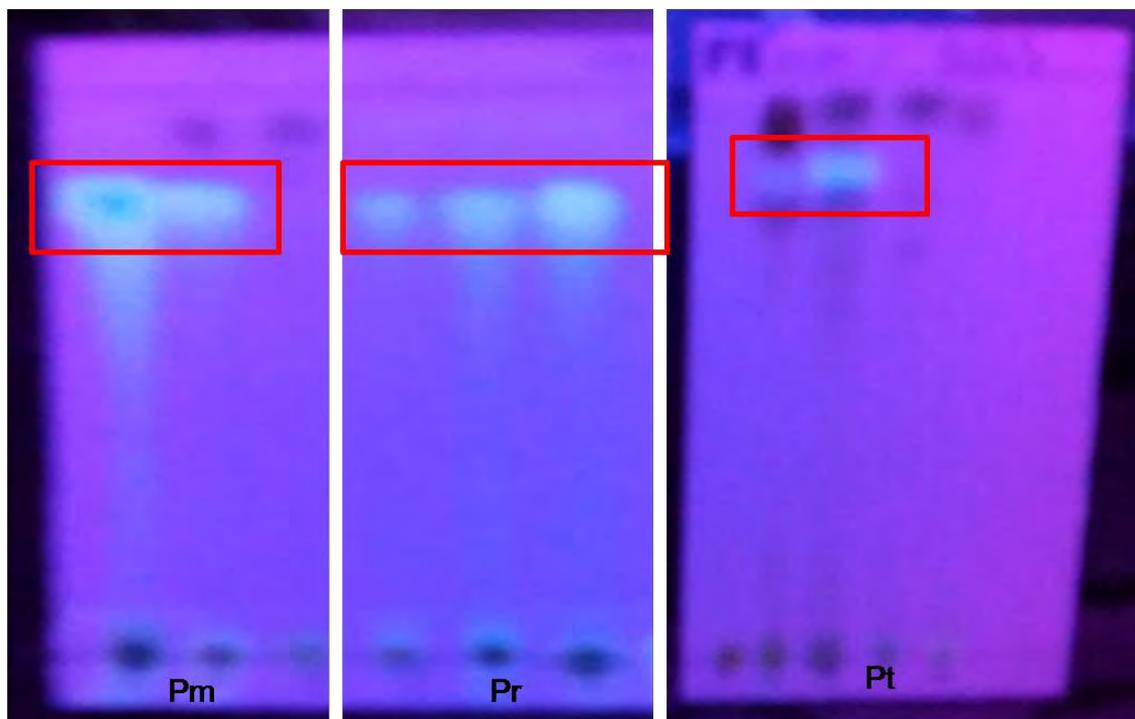
**Figura 27** - Esquemas e imagem de placas cromatográficas com extratos de acetato de etila, diclorometano e metanólico em eluentes hexano/acetato de etila (7:3), acetato de etila/acetona (3:7) e clorofórmio/metanol (9:1) aspergidas com cloreto de alumínio.



Legenda: (Ext. AC.et.)- extrato de acetato de etila, (Ext. dic.)- extrato diclorometano e (Ext.met.)- extrato metanólico. Banda roxa azulada em UV curta indicando possível presença de flavonoide em *Palicourea tetraphylla*.

A comparação entre os extratos metanólicos das espécies *P. rudgeoides*, *P. marcgravii* e *P. tetraphylla* quando observados sob luz UV longa demonstraram que estes apresentam perfis cromatográficos similares devido à presença de uma fluorescência azul nas três espécies, o que pode indicar a presença de cumarinas (Fig. 28).

**Figura 28** - Perfis cromatográficos evidenciando a similaridade dos extratos metanólicos das três espécies.

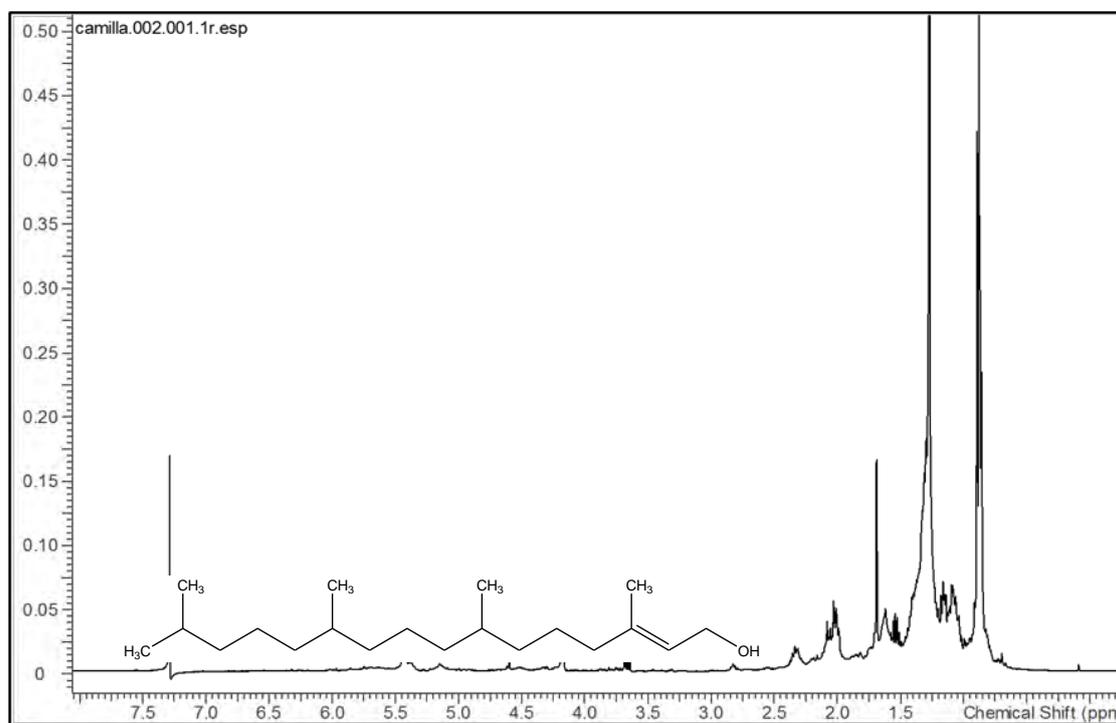


Legenda: Pm = *P. marcgravii*, Pr = *P. rudgeoides* e Pt = *P. tetraphylla*. Placas eluídas em acetato de etila/acetona (7:3).

### **Identificação de substâncias de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla***

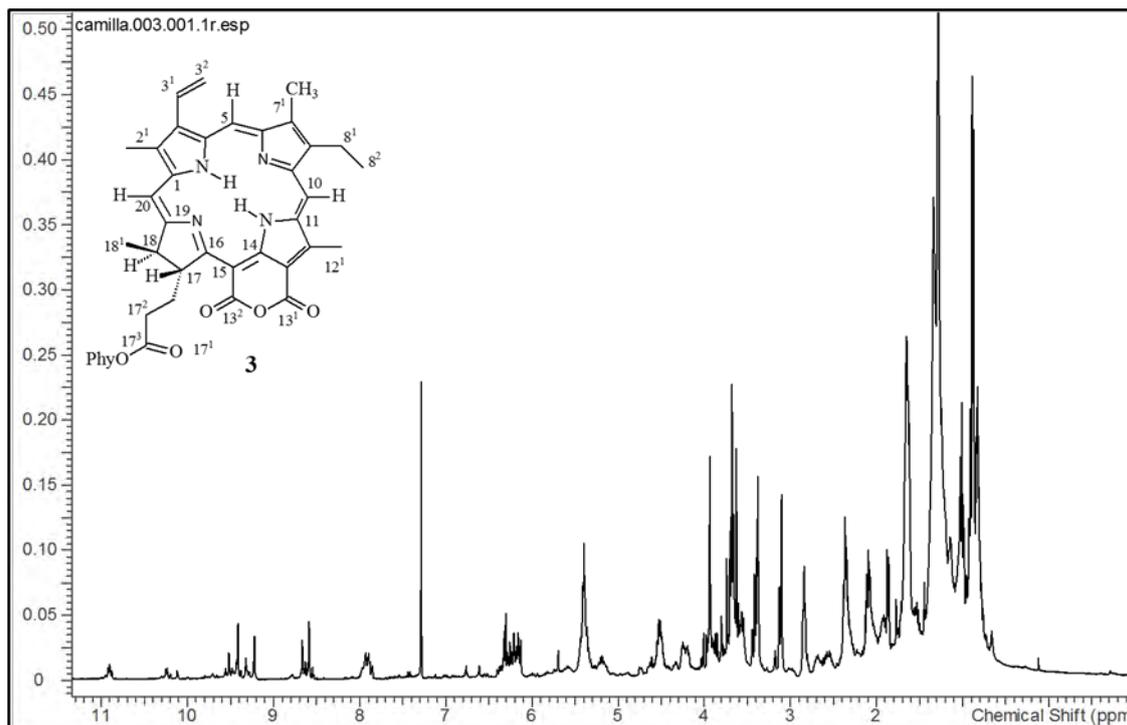
A análise dos dados espectroscópicos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  de RMN obtidos e sua comparação com a literatura levaram a identificação na fração 16-25 proveniente do extrato em diclorometano de folhas de *P. tetraphylla* do fitol (**1**) e na fração 34-35 de uma feofitina a purpurina 18-fetil éster (**2**). Abaixo estão os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das duas substâncias evidenciando os principais deslocamentos químicos e suas respectivas estruturas.

**Figura 29** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fitol (**1**,  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).



Legenda: RMN de  $^1\text{H}$  400 MHz do fitol.

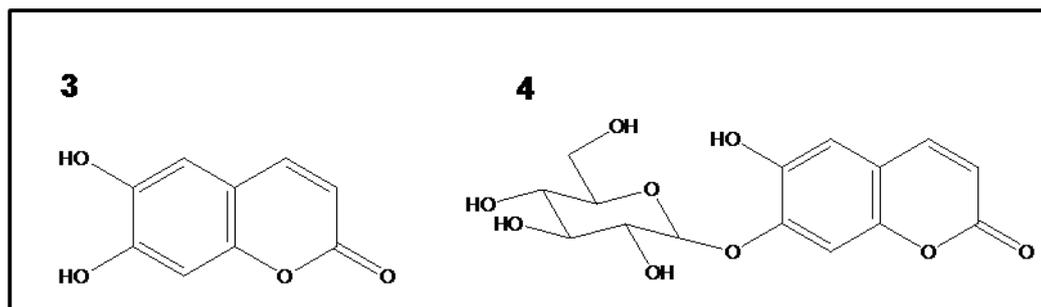
**Figura 30** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da purpurina 18 fitil éster (**2**,  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).



Legenda: RMN de  $^1\text{H}$  400 MHz da purpurina 18 fitil éster

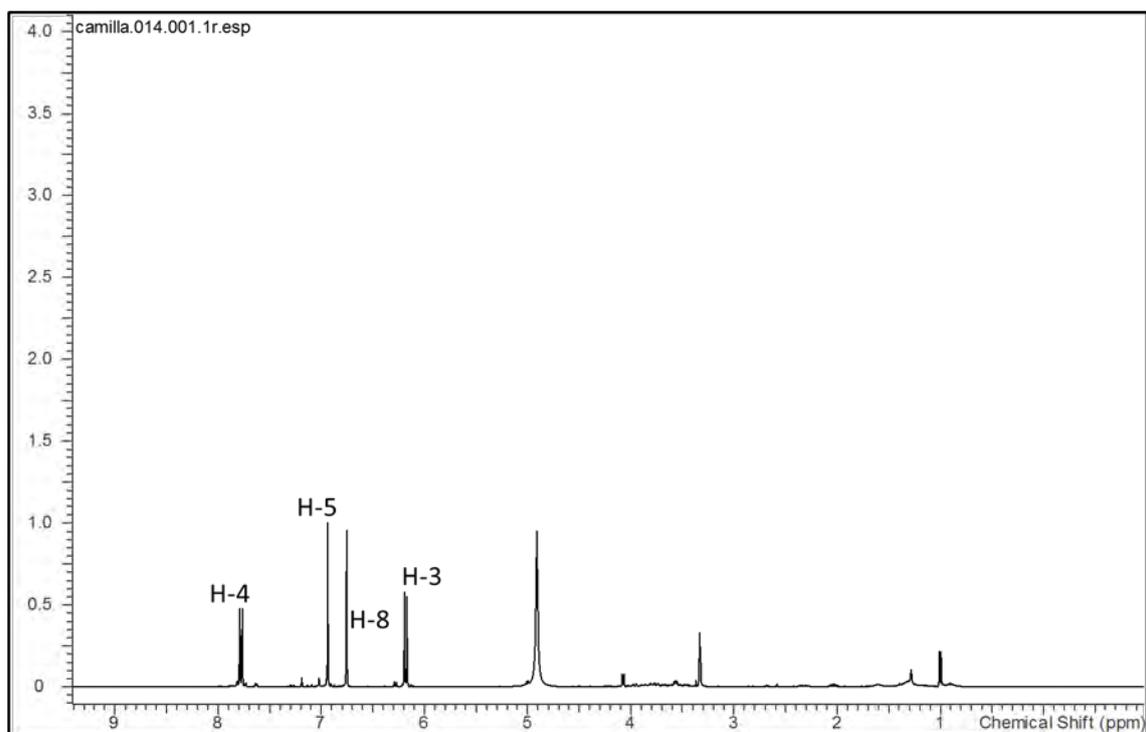
Os precipitados separados dos extratos em acetato de etila e metanólico de *P. rudgeoides* possibilitaram o isolamento de duas cumarinas **3** e **4** (Fig. 31). A cumarina **3** (Fig 31) foi isolada como um sólido branco solúvel em metanol. Os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio demonstravam a presença de dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,9 e  $\delta_{\text{H}}$  6,75 ppm referentes aos hidrogênios em H-5 e H-8 do anel aromático (Fig. 32). Dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,18 e  $\delta_{\text{H}}$  7,66 ppm evidenciavam a presença de H-3 E H-4 do esqueleto cumarínico com substituições em 7 e 8. Os demais dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 33) desta substância pode ser encontrado na tabela número abaixo e foram comparados com a literatura (WEN-ZHI et al. 2009). A substância **3** foi identificada como a esculetina.

**Figura 31** - Estruturas das substâncias **3** (MeO-d<sub>4</sub>) e **4** (piridina-d<sub>5</sub>).



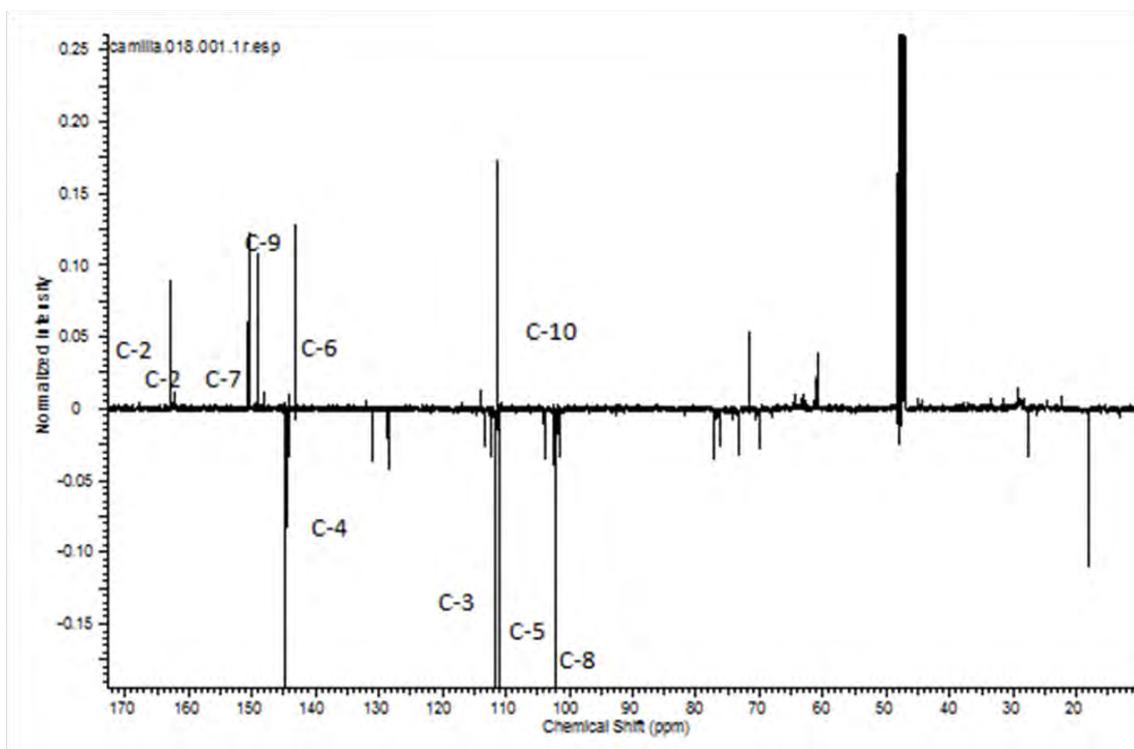
Legenda: Esculetina e cichoriina isoladas de *P. rudgoides*.

**Figura 32** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da esculetina (**3**, CD<sub>3</sub>OD).



Legenda: RMN de <sup>1</sup>H 400 MHz da esculetina.

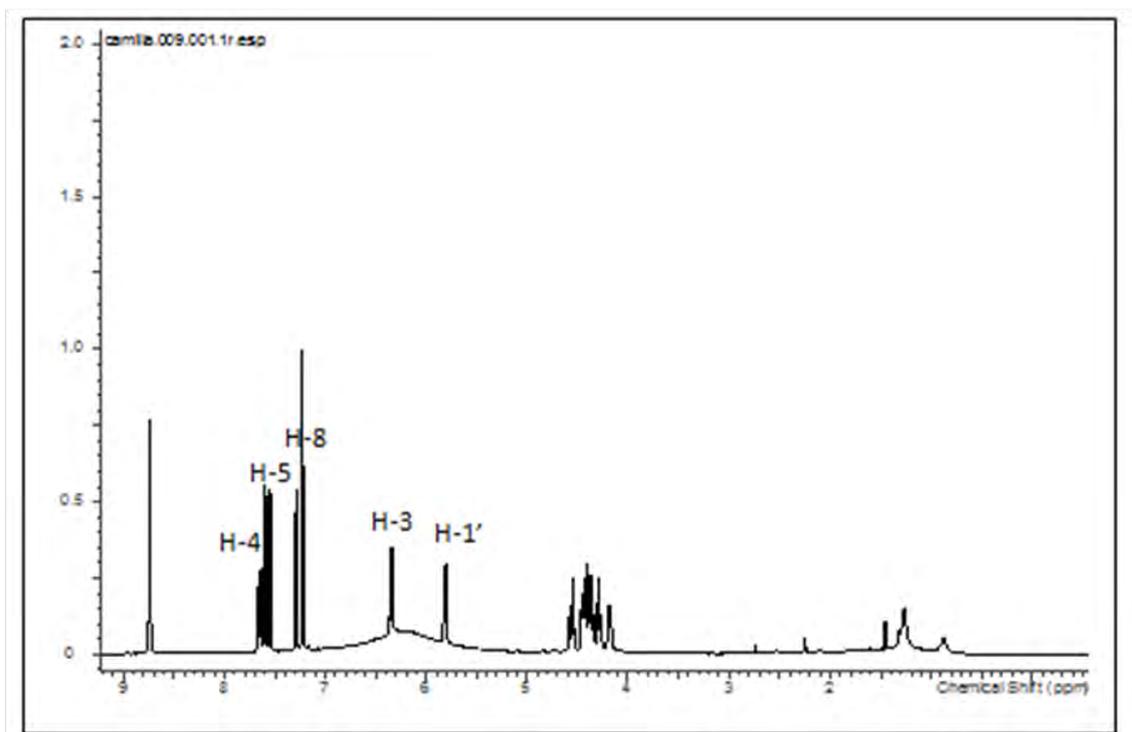
**Figura 33** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da esculetina (**3**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



Legenda: RMN de  $^{13}\text{C}$  400 MHz da esculetina.

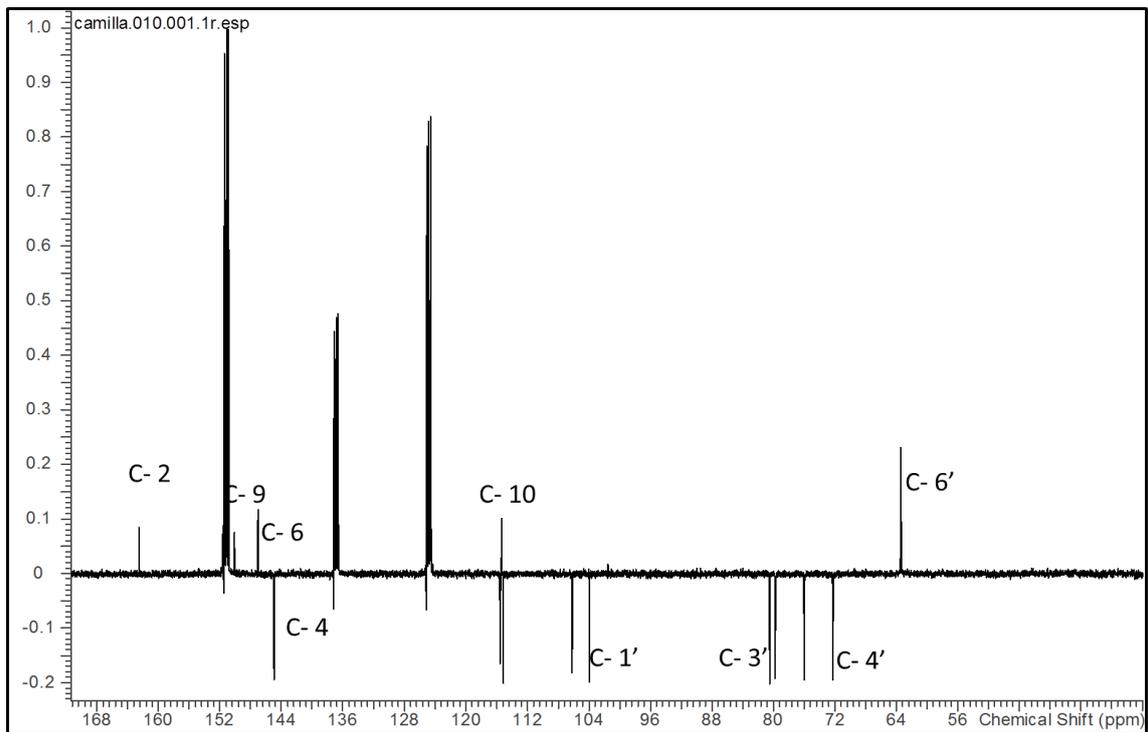
A cumarina **4** (Fig. 31) foi isolada como um sólido branco solúvel em piridina. Os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio demonstravam o mesmo padrão de deslocamentos químicos descritos para a esculetina com a presença de sinais de deslocamento químico característicos para uma unidade de açúcar entre  $\delta_H$  5,81 e 4,19 ppm (Fig. 34). A presença e a identificação da glicose foram confirmadas pelos dados de RMN  $^{13}C$  (Fig. 35) desta substância e comparados à literatura e podem ser encontrado na tabela 9. A correlação evidenciada no espectro de NOE entre H-1' da glicose e H-8 confirmou a posição do açúcar em C-7. A substância **4** foi identificada como a cichoriina, isolada da fração como um sólido branco solúvel em piridina proveniente do extrato em metanol de *P. rudgeoides*.

**Figura 34** - Espectro de RMN de  $^1H$  da cichoriina (**4**, piridina-d<sub>5</sub>, 400MHz).



Legenda: RMN de  $^1H$  400 MHz da cichoriina.

**Figura 35** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da cichoriina (**4**, pirdina-d5, 400MHz).



Legenda: RMN de  $^{13}\text{C}$  400 MHz da cichoriina.

**Tabela 12:** Valores de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN e correlações NOE das substâncias **3** (em CD<sub>3</sub>OD) e **4** (piridina-d<sub>5</sub>).

C	3		4		NOE substância 4	Esculetina. DMSO-d <sub>6</sub> . Yang <i>et al.</i> , 2009.		Cichoriina. DMSO –d <sub>6</sub> . Yang <i>et al.</i> , 2009.	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	162,9	-	162,5	-		160,7	-	160,5	-
3	112,4	6,18(d, 9,6Hz)	115,6	6,34(d, 9,2Hz)		111,5	6,16(d, 9,4Hz)	113,4	6,29 (d, 9,5)
4	144,7	7,66(d, 9,6Hz)	144,9	7,64(d, 9,2Hz)		144,4	7,85 (d, 9,4 Hz)	144,1	7,92 (9,5 Hz)
5	111,2	6,9 (s)	106,2	7,54(s)	H-4	112,3	6,97 (s)	112,9	7,14 (s)
6	143,1	-	147,1	- C-10		142,9	-	143,6	-
7	150	-	151,6	-		150,4	-	148,8	-
8	102,0	6,75(s)	115,1	7,28(s)	H-1'	102,7	6,74 (s)	103,4	7,09 (s)
9	148,9	-	150,1	-	C-1'	148,5	-	147,8	-
10	111,3	-	115,3	-		110,8	-	112,6	-
1'	-	-	103,9	5,81(d, 8Hz)		-	-	101	-
2'	-	-	76,0	4,28(t, 8Hz)		-	-	73,1	-
3'	-	-	80,5	4,41(t, 8Hz)		-	-	75,8	-
4'	-	-	72,3	4,36(t, 8Hz)		-	-	69,8	-
5'	-	-	79,7	4,19(m)		-	-	77,3	-
6'(CH <sub>2</sub> )	-	-	63,4	4,56(dl, 12Hz, H-6'a); 4,46(dd,12Hz, 4,8Hz, H-6'b)		-	-	60,7	-

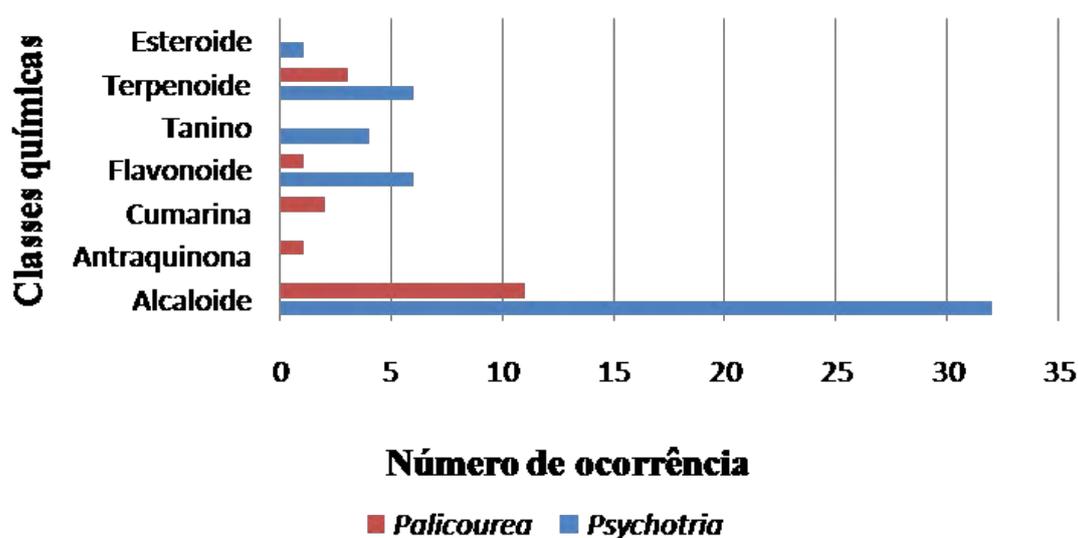
Legenda: Deslocamentos químicos em ppm a partir do TMS.

### Quimiosistemática

Os índices químicos calculados com base nos resultados das tabelas 13 e 14 (em anexo) indicaram a presença das classes químicas: alcaloide, antraquinona, cumarina, flavonoide, terpenoide e esteróide.

O número de ocorrência, também calculado com base nos resultados das tabelas 13 e 14 (em apêndice), indicou um total de 22 diferentes espécies de *Palicourea* e 39 de *Psychotria*. A comparação do perfil químico para os gêneros está indicada na figura 35.

**Gráfico 5:** Perfil químico dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*.



Alcaolide foi a classe química mais representativa para ambos os gêneros, seguida por terpenoide e flavonoide. Foram encontrados quatro tipos de alcaolide para *Palicourea* (pirrolidinoindolínico, indólico, indol monoterpênico e iridoídico) e quatro para *Psychotria* (pirrolidinoindolínico, indólico, indol monoterpênico e isoquinolínico). Com base nestes tipos foram calculados os índices de diversidade de alcaolide para os gêneros (tabela 15).

**Tabela 15-** Relação do número de ocorrências, número de tipos e índice de diversidade.

<i>Palicourea</i>	Classe química	NO	NT	ID
	alcaloide	11	4	5,3
	antraquinona	1	-	-
	cumarina	2	-	-
	flavonoide	1	-	-
	terpenoide	3	-	-
<i>Psychotria</i>	Classe química	NO	NT	ID
	alcaloide	32	4	4,7
	flavonoide	6	-	-
	tanino	4	-	-
	terpenoide	6	-	-
	esteróide	1	-	-

Legenda: NO = Número de Ocorrências, NT = Número de Tipos, ID = Índice de Diversidade. Número de espécies trabalhadas (*Palicourea* = 22 e *Psychotria* = 39).

Também foi feita a quantificação do grau de proteção em *Palicourea rigida*. As agliconas encontradas foram quercetina e isorhamnetina, com padrões de substituições ocorrendo nas posições 3 e 3'. O mecanismo de proteção à hidroxila flavonoídica mais comum ocorre por glicosilação. A metilação e a glicosilação foi encontrada na isorhamnetina, que apresentou um índice de proteção de 0,40. O grau de desproteção foi bem elevado igual a 0,80 (tabela 16).

**Tabela 16-** Quantificação do grau de proteção das hidroxilas flavonoídicas encontradas em *Palicourea rigida*

	Aglicona			Substituintes das posições						
	3	5	7	3'	4'	5'	IM	IG	IP	ID
Qu	OGli	OH	OH	OH	OH	-	0	0.20	0.20	0.80
Qu	OGli	OH	OH	OH	OH	-	0	0.20	0.20	0.80
Is	OGli	OH	OH	OMe	OH	-	0.20	0.20	0.40	0.60

Legenda: IM= Índice de Metilação; IG= Índice de Glicosilação; IP= Índice de Proteção; ID= Índice de Desproteção; Qu= Quercetina; Is= Isorhamnetin; OH= hidroxila; OGli= O-glicosídeo; OMe= O-metila.

#### 5.4 Discussão

O estudo fitoquímico das folhas de *P. marcgravii*, *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* resultou no isolamento e identificação de produtos da clorofila: fitol e a feofitina (purpurina 18 fitil éster), e de duas cumarinas: esculetina e cichoriina. As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas com base nos dados de espectroscopia de ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN), além da comparação com dados da literatura.

O fitol foi um dos constituintes da clorofila isolado da fração 16-25 proveniente do extrato em diclorometano de *P. tetraphylla*. Esta substância foi descrita no extrato de *Morinda morindoides* (Rubiaceae) e *Hedyotis leschenaultiana* (Rubiaceae) (BI KOUAME et al. 2010; THERESE; TRESINA; MOHAN 2012). Fitol é um álcool acíclico diterpeno que pode ser utilizado como um precursor para a fabricação de formas sintéticas da vitamina E e K (NETSCHER 2007). O fitol já demonstrou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* (YOSHIHIRO et al. 2005). A espécie *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. mostrou ser uma fonte potencial de fitol trans com atividade antiplasmódica (malária), antibacteriana (*Escherichia coli*) (BI KOUAME et al. 2010), anticancerígena, anti-inflamatória (KALA 2012; PRAVEEN 2010) e atividade antidiabética em pacientes com diabetes tipo II (CATY 2001).

A feofitina purpurina 18 fitil éster foi isolada da fração 34-35 proveniente do extrato em diclorometano de *P. tetraphylla*. Essa substância foi isolada também de organismo

marinho, *Ruditapes philippinarum*, (OCAMPO; SACHS; REPETA 1999), de cianobactéria, *Spirulina maxima* (DROGAT et al. 2011) e isolada da planta *Talinum triangulare* (Portulacaceae) (DE OLIVEIRA AMORIM et al., 2014). Essa espécie é consumida em algumas regiões do Brasil especialmente no Pará devido ao seu alto teor nutricional podendo substituir o espinafre (CHAVES et al. 2015). Feofitina também foi identificada como um produto de clorofila extraído a partir de folhas de *Spinacia oleracea* (espinafre) (RODRIGUES; FURLAN 2003; CHAVES et al. 2015). No tratamento de certos tipos de câncer por terapia fotodinâmica pode ser usada a molécula orgânica da feofitina, classificada como fotossensibilizadora de segunda geração (BEN DROR et al. 2009). A feofitina purpurina 18 fitil éster liga-se moderadamente a albumina do soro humano. Essa associação é favorável para a sua eficiente distribuição pelo plasma sanguíneo e somado a isso a molécula é capaz de absorver a radiação no infravermelho devido a elevada capacidade de penetração desta radiação nos tecidos, sem causar danos a saúde (LUO et al. 2011).

Esculetina foi isolada como um sólido branco solúvel em metanol proveniente do extrato em acetato de etila de *P. rudgeoides*. É uma cumarina simples hidroxilada no anel benzênico (BOURGAUD et al. 2006), encontrada em muitas plantas medicinais (SUBRAMANIAM; ELLIS 2011). Na literatura, foi relatada por ter vários efeitos biológicos, incluindo anti-proliferativa e atividade antioxidantes (EGAN et al. 1990; LIN et al. 2000; WANG et al. 2002; KOK et al. 2009) e, efeito protetor na nefropatia diabética atenuando o stress oxidativo mediando a hiperglicemia (PRABAKARAN; ASHOKKUMAR 2013). Além disso, esta substância demonstrou ser eficiente no tratamento de catarata induzida por galactose (KIM et al., 2016).

A análise do perfil químico dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, permitiu observar que o alcaloide foi a classe química mais encontrada em ambos os gêneros, corroborando os estudos que relatam esta classe como tendo ampla distribuição nas espécies da família Rubiaceae (CARBONEZI et al. 1999; CORDELL et al. 2001; LOPES et al. 2004; HENRIQUES et al. 2004; MORAES et al. 2011; MARTINS; NUNEZ 2015), e, também na subfamília Rubioideae (DELPRETE et al. 2006).

Dentro dessa classe foram encontrados três tipos de alcaloide para ambos os gêneros: pirrolidinoindolínico, indólico, indólico monoterpênico. O tipo iridoídico foi relatado apenas para *Palicourea* e o tipo isoquinolínico apenas para *Psychotria*. O tipo pirrolidinoindolínico é considerado o principal grupo de metabólitos especiais encontrados em espécies do gênero *Psychotria* (VEROTTA et al., 2002; MOURA; MARUO 2014). Os alcaloides hodgkinsina,

psychotridina, iso-psychotridina A, iso-psychotridina B e quadrigemina C, foram isolados de *Psychotria oleoides*, *P. beccaroides*, *P. forsteriana*, *P. lyciiflora* e *P. colorata* mas também foram encontrados em *Palicourea colorata*, *P. coreacea*, *P. dominguensis* além de *P. ovalis* (ADJIBADÉ et al. 1992; VERROTTA et al. 1998; JANNIC et al., 1999; AMADOR et al., 2001).

Willians (2001) em sua revisão sobre a composição química de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. descreveu a presença de alcaloide indólico. Uma característica importante de alguns compostos indólicos é que estes podem ser úteis como agentes químicos preventivos contra doenças como o câncer e o estresse oxidativo (CANO; ALCARAZ; ARNAO, 2003). *Palicourea* é um gênero conhecido pela biossíntese de alcaloides indólicos como: a secologanina, palinina, palicosídeo e lialosídeo (DUSMAN et al., 2004).

Farias et al. (2009) isolou a strictosamida, um alcaloide indólico monoterpênico, de *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl.) Wawra e sugeriu que esse possa ser um tipo de alcaloide comum na biossíntese de alcaloide encontrado em *Psychotria*. Düsman (2004) isolou esse mesmo alcaloide, a croceína, a partir das folhas de *Palicourea croceae*.

O levantamento bibliográfico e os cálculos de índices químicos nesse trabalho, também permitiram indicar o alcaloide iridoídico como marcador do gênero *Palicourea*. A tendência na produção desses alcaloides tem sido observada por diversos autores, tanto no subgênero *Heteropsychotria* Steyerm. quanto, no gênero *Palicourea* (TAYLOR 1997; DE SANTOS et al. 2001; LOPES et al. 2004; BERGER et al. 2012). Esses resultados reiteram a divisão taxonômica e sugerem a incorporação de espécies do subgênero *Heteropsychotria* ao gênero *Palicourea*, como já havia sido proposto por Taylor e colaboradores (2010; 2011) e Borhidi (2011), baseados em caracteres morfológicos.

A determinação de índices químicos neste trabalho, também permitiu observar que o tipo alcaloide isoquinolínico foi encontrado somente em espécies do gênero *Psychotria*. O gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcaloides cujo aminoácido de origem é o triptofano. Estes são, na maior parte, indol não iridoídico, não havendo relação com monoterpenos (RIVIER; LINDGREN 1972; HEMINGWAY; PHILIPSON 1980).

Terpenoide, flavonoide e cumarina também foram encontradas em ambos os gêneros comparados. Tan; Eusebio; Alejandro (2012) isolaram o terpenoide vomifoliol das folhas de *Psychotria gitingensis* Elmer, substância, que segundo estes, nunca havia sido relatada em *Psychotria*. A presença ou ausência de vomifoliol ou os seus análogos estruturais podem ser

usados para identificar relações infragenéricas particularmente na atribuição de suas seções taxonômicas.

Os flavonoides ocorrem ocasionalmente como agliconas, os flavonóis são os mais comuns das plantas, sendo a quercetina a substância de ocorrência natural mais comum (HALL 1997; ROBBINS 2003). A quercetina foi isolada em *Palicourea rigida* (ROSA et al. 2010) e em algumas *Psychotria* (FORMAGIO et al. 2014). Cumarinas foram isoladas em *Palicourea rudgeoides*, nesse estudo, e haviam sido citadas por El seedii (1999) em *Palicourea demissa*. Essa classe química foi também isolada apenas em *Psychotria vellosiana* Benth. (MORENO et al. 2014).

A presença de Cumarina em *Palicourea rudgeoides* e, possivelmente, em *P. marcgravii* e *P. tetraphylla*, somada à presença de alcaloide iridoídico em *Palicourea* e de alcaloide isoquinolínico em *Psychotria*, podem ser consideradas como importantes marcadores taxonômicos para esses gêneros.

## 6 Conclusões

1. A anatomia e ultraestrutura revelaram algumas características frequentemente associadas com a anatomia da família e também outras relacionadas aos diferentes tipos de fatores ambientais. Cabe ressaltar a importância da anatomia foliar no diagnóstico para as seis espécies de *Palicourea*; enfatizando as características que indicam grupos infragênicos. *P. fulgens* ficou mais distante do grupo formado por *P. longipedunculata* e *P. marcgravii* devido ao formato em "U" do sistema vascular do pecíolo. Neste sentido, mais estudos comparativos deste e outros gêneros da circunscrição atual de Palicoureeae, devem ser realizados para que mais dados possam ser obtidos e analisados na revisão sistemática da Rubioideae.
2. Dentre as três espécies testadas na atividade antifúngica e antiparasitária, *P. rudgeoides* foi a que apresentou melhores resultados na diminuição dos epimastigotas de *T. cruzi* com destaque para os extratos butanólico, metanólico e acetato de etila. Contudo, nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* e do fungo filamentosso *F. solani*. A atividade encontrada para os extratos metanólicos e em acetato de etila de *P. rudgeoides* pode estar relacionada às cumarinas que foram as substâncias majoritárias encontradas nos mesmos. Porém, mais análises espectrométricas dos extratos devem ser feitas com o intuito de elucidar qual, ou quais, outros metabólitos presentes podem ter sido responsáveis pelos resultados obtidos.
3. A avaliação inicial da fitoquímica foliar indicou presença de cumarina em *P. rudgeoides* e sua possível presença em *P. marcgravii* e *P. tetraphylla*. A avaliação quimiotaxômica mostrou que os alcaloides foram descritos como grupo de substâncias de maior ocorrência para os gêneros tabelados, sendo os tipos: alcaloides pirrolidinoindolínico, indólico e indolólico monoterpenoídico comuns aos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*. A avaliação também revelou uma tendência na produção de alcaloide iridoídico em *Palicourea* e alcaloide isoquinolínico em *Psychotria*. Embora os alcaloides não tenham sido encontrados nas espécies trabalhadas, até o presente momento, os resultados

revelam que a presença de alcaloide iridoídico e cumarina talvez possa servir como marcadores para *Palicourea*.

## APÊNDICE

**Tabela 13:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Palicourea*

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>P. acuminata</i>	folha, pecíolo e raiz	alcaloide iridoídico: lagambosideo	Berger et al. 2012
<i>P. adusta</i>	folha	alcaloide glucoindólico monoterpênico: lialosideo	Valverde et al. 1999
<i>P. aeneofusca</i>	órgãos vegetativos	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
<i>P. alpina</i>	Sem informação	alcaloide indólico: palinina	Stuart 1974
<i>P. amapaensis</i>	órgãos vegetativos	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
<i>P. colorata</i>	folha	alcaloides pirrolinoindólicos: psycotridina; hodgkisina; isocalicantina e calicantina	Moura; Maruo 2014
<i>P. coriacea</i>	folha	antraquinona: 2-hydroxy-3- metilanthraquinona alcaloide pirrolinoindólico: calicantina triterpeno: ácido ursólico	da Silva et al. 2008
	folha e raiz	alcaloide glucoindólico: ácido 3-epi-strictosidínico, ácido strictosidínico; strictosidínico alcaloide pirrolinoindólico: calicantina triterpeno: ácido ursólico	Do Nascimento et al. 2006

---

raiz

alcaloide indólico: tetraidro  $\beta$ -carboline

Do Nascimento et al.

2008

---

**Tabela 13:** Classes químicas e substâncias isoladas do gênero *Palicourea* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>P. corymbifera</i>	folha	alcaloide e esteroide	Mesquita et al. 2015
		monofluoroacetato (MFA)	Assis et al. 2006
<i>P. crocea</i>	partes aéreas	alcaloide indólico monoterpênico: 3,4-dihydro-1-(1-β-D-glucopyranosyloxy-1,4α,5,7-tetrahydro-4-methoxycarbonylcyclopenta[c]pyran-7-yl)-β-carboline-N <sub>2</sub> -oxide	Narine; Maxwell 2009
		alcaloide indólico monoterpênico: croceaína A	
		alcaloide glucoindólico monoterpênico: psicolatina	
		alcaloides indólicos monoterpênicos: croceaínas A–B	Düsman et al. 2004
	folha	alcaloides iridoídicos: strictosidínico, lialosideo, (E)-O-(6'')-(4'')-hidroxi-3'') , 5'')-dimetoxi)-cinamoil lialosideo	Berger et al. 2015
<i>P. demissa</i>	galho e folha	cumarinas, ácidos benzoicos e terpenoides	El-Seedi 1999
<i>P. domingensis</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico: chimonantina	Ripperger 1982
		alcaloide, esteroide and flavonoide	Mesquita et al. 2015
<i>P. guianensis</i>	folha	alcaloides	Lebrini; Roos 2011
<i>P. grandiflora</i>	folha	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
<i>P. juruana</i>	folha	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014

**Tabela 13:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Palicourea* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>P. longiflora</i>	folha	ácido monofluoroacético	Coelho et al. 2007
		monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
<i>P. macarthurorum</i>	folha	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
		monofluoroacetato (MFA)	Kemmerling 1996; Lee et al. 2012; Peixoto et al. 2012; Cook et al. 2014
<i>P. marcgravii</i>	folha	ácido monofluoroacético	Krebs et al. 1994; Silva et al. 2011
		monofluoroacetato de sódio(SMFA)	Moraes-Moreau 1995
<i>P. nigricans</i>	folha	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014
<i>P. ovalis</i>	flores e frutos	alcaloide pirrolinoindólico: calicantina	García et al. 1997
	partes aéreas	alcaloide indólico: vallesiacotamina	Soares et al. 2012
		triterpeno	Bolzani, et al. 1992
<i>P. rigida</i>	folha	alcaloide: loganina	Lopes et al. 2004
		flavonoide	Silva et al. 2008
		flavonoide: quercetina 3-O-β-D-glicosídeo; quercetina 3-O-soforosídeo and isoraminetina 3--glicosídeo	Rosa et al. 2010

**Tabela 13:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Palicourea* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>P. rudgeoide</i>	folha	cumarina	Alexandrino et al. 2016
<i>P. vacillans</i>	órgãos vegetativos	monofluoroacetato (MFA)	Cook et al. 2014

**Tabela 14:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Psychotria*

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>Psy. bahiensis</i>	folha	Bis (monoterpenoide) alcaloide indólico glucosídeos: bahienosídeo A; bahienosídeo B	Paul et al. 2003
<i>Psy. barbiflora</i>	folha	alcaloide indólico: $\beta$ -carboline	Oliveira et al., 2013
<i>Psy. borucana</i>	raiz	alcaloide monoterpênico isoquinoleínico: emetina, cefaelina e glicosídeos	Bernhard et al. 2011
<i>Psy. brachyceras</i>	folha	alcaloide indólico monoterpênico: brachicerine	Lopes et al. 2004; Nascimento et al, 2007, 2013; Kerber 2001
<i>Psy. calocarpa</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico trimérico: psychotriasina	Zhou et al. 2010
<i>Psy. capillacea</i>	folha	flavonoide: flavonol; tanino condensado	Formagio et al. 2014
<i>Psy. capitata</i>	folha	alcaloide indólico: 5,6-dihydro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. carthagenensis</i>	folha	triterpenos: $\beta$ -sitosterol and ácido ursólico	Lopes et al. 2000
	folha	flavonoide: flavonol; tanino condensado	Formagio et al. 2014
<i>Psy. colorata</i>	flor	alcaloide pirrolinoindólico: calicantina, isocalicantina, chimonanthina, hodgkinsina, quadrigemina C, tetrahydroisocalycanthine	Verrotta et al. 1998
	folha	alcaloide pirrolinoindólico: psychotridine, hodgkinsine, isocalycanthine and calicantina	Moura; Maruo 2014
<i>Psy. correae</i>	folha e raiz	alcaloide indólico: isodolichantosídeo, correantosídeo, hidroxicorreantosídeo, correantines	Achembach et al. 1995
<i>Psy. deflexa</i>	folha	flavonoide: flavonol; tanino condensado	Formagio et al. 2014
<i>Psy. emetica</i>	folha	Terpeno: iridoide glicosídeos -asperulosídeo, 6-hidroxigeniposídeo, ácido deacetylasperulosídico e ácido asperulosídico	Berger et al. 2011

**Tabela 14:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>Psy. forsteriana</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico: calicantina, iso-calicantina and meso-chimonantina	Adjibadé et al. 1992
<i>Psy. glasiovii</i>	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. gitingensis</i>	folha	terpeno: sesquiterpene - vomifoliol	Tan et al. 2012
<i>Psy. glomerulata</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico: glomerulatinas, calicantina and iso-calicantina	Solís et al. 1997
		flavonoides: ácido esteárico, quercetina, rutina, caempferol-7-O-glucopiranoside, campferol-3-O-rutinosideo e daucosterol	
<i>Psy. hainanenses</i>	folha	esteroide: $\beta$ -sitosterol	Li, et al. 2011a
<i>Psy. henryi</i>	folha	alcaloides	Liu et al. 2013
<i>Psy. ipecacuanha</i>	root	alcaloide monoterpênico isoquinoleínico: emetina; cefaeline	Garcia et al. 2005
	Folha e raiz		Nomura et al. 2008
<i>Psy. klugii</i>	folha	alcaloide monoterpênico isoquinoleínico: klugine, O-demetilisocefaeline, cefaeline, isocefeline e O-metilipecosideo	Muhammad et al. 2003
<i>Psy. lacinata</i>	folha	alcaloide	Passos et al. 2013
		alcaloide indólico: N, $\beta$ -d-glucopyranosyl vincosamide	Henriques et al. 2004
	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. leiocarpa</i>		alcaloide indólico monoterpênico: umbellatina, brachicerina, lialosideo, strictosamídeo, myrianthosinas, quadrigemina A	Lopes et al. 2004
		flavonoide: flavonol; tanino condensado	Formagio et al. 2014
<i>Psy. lyciflora</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico: meso-chimonanthina, hodgkinsina, N-demetil-meso-chimonanthine, quadrigemina C, isopscotridina B, psychotridina, quadrigemina, oleoidina and caledonina	Jannic et al. 1999
<i>Psy. myriantha</i>	folha	alcaloides	Lopes et al. 2004; Farias et al. 2010, 2012

**Tabela 14:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
<i>Psy. nuda</i>	folha	alcaloide indólico monoterpênico: strictosamideo	Farias et al. 2009
		alcaloide indólico: 5,6-dihidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. oleoides</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico: meso-chimonanthina; hodgkinsina; N-demetil-meso- chimonanthina; quadrigemine C; isopsycotridina B; psychotridina; quadrigemina I; oleoidina and caledonina	Guéritte-Voegelein et al. 1992
		alcaloide pirrolinoindólico trimérico: psycholeina	Rasolonjanahary et al. 1995
		alcaloide pirrolinoindólico: quadrigemina I, oleoidina e caledonina	Jannic et al. 1999
<i>Psy. pilifera</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico trimérico: psychotripina	Li et al. 2011
	folha	alcaloide indólico monoterpênico: strictosamideo	Faria et al. 2010
<i>Psy. prunifolia</i>	raiz e ramos	alcaloide indólico monoterpênico: 10-hydroxyisodeppeaninol, N-oxide-10-hidroxiantirrina, 14-oxoprunifoleina; strictosamideo	Kato et al. 2012
	raiz	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Oliveira et al. 2014
<i>Psy. pubigera</i>	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. racemosa</i>	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. rostrata</i>	folha	alcaloide pirrolinoindólico trimérico: psychotrimina, psychopentamina	Takayama et al. 2004
	Sem informação	alcaloide pirrolinoindólico trimérico: psychotrimina	Matsuda et al. 2008
<i>Psy. rubra</i>	raiz	terpeno: iridoide	
		flavonoide: flavonas	Lu et al. 2014
<i>Psy. ruellifolia</i>	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. stachyoides</i>	folha e ramos	alcaloide indólico monoterpênico (MIA)	Pimenta et al. 2010
	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011

**Tabela 14:** Classes químicas e substâncias isoladas de espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Orgãos</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referências</b>
		alcaloide indólico monoterpênico: lialosídeo, naucletina e strictosamídeo	De Santos et al. 2001
<i>Psy. suterela</i>	folha	alcaloide indólico monoterpênico: lialosídeo e strictosamídeo	Lopes et al. 2004
		alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
	folha	alcaloide indólico monoterpênico (MIA)	Passos et al. 2013
	folha	alcaloide indólico: psychollatina	Fragoso et al. 2008
<i>Psy. umbellata</i>	folha	alcaloide glucoindólico: psychollatina	Paranhos et al. 2009
	folha	alcaloide indólico: psychollatina	Kerber 2014
	folha	alcaloide indólico monoterpênico: umbellatina	Lopes et al. 2004
<i>Psy. vellosiana</i>	folha	triterpenos e cumarina	Moreno et al. 2014
	folha	alcaloide indólico: 5,6-di-hidro- $\beta$ -carboline	Moraes et al. 2011
<i>Psy. viridis</i>	folha	alcaloide: dimetilriptamina	Blackledge; Taylor 2003
<i>Psy. yunnanensis</i>	folha	terpenos e substâncias fenólicas	Lu et al. 2014

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H. et al. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1537-1545, 1995.

ADJIBADÉ, Y. et al. Dimeric alkaloids from de *Psychotria forsteriana*. **Phytochemistry**, v. 31, n.1, p. 317-319, 1992.

ADLER, E.; BJORKQVIST, K.; HAGGROTH, S. Colour reaction of wood. **Acta Chemica Scandinavica**, n. 2, p. 93-94, 1948.

AGUIAR, A. T. da E. Atributos químicos de espécies de café. **Tese**, p. 86, 2005.

AGUILAR, J. L. et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 271-276, 2002.

ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116–121, 2010.

ALEXANDRINO, C. R. Caracterização estrutural, fitoquímica e atividade biológica de extratos foliares de espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) da Mata Atlântica. **Tese** apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 160, 2016.

ALI, H. et al. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal Ethnopharmacology**, n. 83, p. 219-228, 2002.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2014.

ALVES, R. M. S. et al. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 49-56, 2004.

AMADOR, T. A. et al. Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of

psychotridine. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 202-206, 2001.

ANDERSSON, L.; ANTONELLI, A. Phylogeny of the tree Cinchoneae (Rubiaceae), its position in Cinchonoideae, and description of a new genus, *Liliosemina*. **Taxon**, n. 54, p. 17-28, 2005.

ANDERSSON, L.; ROVA, J. H. E. The rps16 intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 214, n. 1-4, p. 161-186, 1999.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 145-180, 2000.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161, p. 105-121, 2009.

ARAÚJO, E.L et al. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): Perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 18 (Supl.), p. 777-784, 2008.

ARRUDA, R.; GOMES, D. Leaf anatomy and micromorphology of six *Posoqueria* Aublet species (Rubiaceae). **Rodriguésia**, n. 61, p. 505-518, 2010.

Assis, J. C. S. R. Analysis of the toxic potential of *Palicourea corymbifera* (Müll. Arg.) Standl. in laboratory animals. **Research in Veterinary Science**, n. 80, p. 209-217, 2006.

BAHADUR, B.; RAJAGOPAL, T.; RAMAYYA, N. Studies on the structural and developmental variation and distribution of stoffloresta in the Rubiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 64, p. 295-310, 1971.

BARTHLOTT, W. et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 126, p. 237-260, 1998.

BALANDRIN, M. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.

BARBOSA, T. C. S. et al. Genetic characterization of natural populations of the

medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 695-704, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products with antileprotic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.

BARRABÉ, L. et al. New Caledonian lineages of *Psychotria* (Rubiaceae) reveal different evolutionary histories and the largest documented plant radiation for the archipelago. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, n. 1, p. 15-35, 2014.

BARREIROS, E. L. Flavonóides como marcadores sistemáticos da família Leguminosae. **Tese de doutorado, USP**, p. 295, 1990.

BARROSO, G. M. et al. Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Imprensa Universitária**, Viçosa, n. 3, p. 1-326, 1991.

BATES, D. M. plant utilization, patterns and prospectes. **Economic Botany**, n. 39, p. 241-265, 1985.

BEN DROR, S. et al. The Localization and Photosensitization of Modified Chlorin Photosensitizers in Artificial Membranes. **Journal Photochemistry Photobiology**, v. 8, p. 354-361, 2009.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565-569, 2004.

BERGER, A. et al. Iridoids as chemical markers of false ipecac (*Ronabea emetica*), a previously confused medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 138, p. 756-761, 2011.

BERGER, A. et al. Loganin and secologanin derived tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 162-9, 2015.

BERGER, A. et al. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (=Psychotria acuminata, Rubiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 558-562, 2012.

- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames, **The Iowa State press**, p. 326, 1976.
- BERNHARD, M. Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 232–235, 2011.
- BI KOUAME, F. P. et al. Volatiles constituents from leaves of *Morinda morindoides* (Rubiaceae): a medicinal plant from the Ivory Coast. **Open Natural Products Journal**, v. 3, p. 6-9, 2010.
- BLACKLEDGE, R. D.; TAYLOR, C. M. *Psychotria viridis* - A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). **Microgram Journal**, v. 1, n. 1-2, 2003.
- BOLZANI, V. da S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.
- BOLZANI, V. da S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. M. Triterpenes of *Palicourea rigida* H.B.K. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, n. 1, p. 20-21, 1992.
- BOLZANI, V. S. et al. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.
- BORGO, M. et al. Espécies arbóreas de um trecho de floresta atlântica do município de antonina, paraná, brasil. **Floresta**, v. 41, n. 4, p. 819-832, 2011.
- BORHIDI, A. Transfer of the Mexican species of *Psychotria* subgen. *Heteropsychotria* to *Palicourea* based on morphological and molecular evidences. **Acta Botanica Hungria**, v. 53, n. 3-4, p. 241-250, 2011.
- BOULOS, M. et al. Avaliação clínica do quinino para o tratamento de malária por *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n.3, p.211-213, 1997.
- BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 293-308, 2006.

BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Cell wall components as taxonomic markers of higher plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 71, p. 175-179, 1999.

BRANDÃO, C. F. L. S. et al. Estrutura fitossociológica e classificação sucessional do componente arbóreo em um fragmento de floresta atlântica em Igarassu–Pernambuco. **revista brasileira de ciências agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 1, p. 55-61, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Diversidade brasileira. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/pot/sbf/chm/biodiv.html>. Acesso em: 8 maio 2016. 2004.

BREMEKAMP, C. E. B. Remarks on the position, the delimitation and subdivision of the Rubiaceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 15, p. 1-33, 1966.

BREDENKAMP, C. L.; VAN WYK, A. E. Leaf anatomy of the genus *Passerina* (Thymelaeaceae): Taxonomic and ecological significance. **Bothalia**, v. 31, n. 1, p. 53-70, 2001.

BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, n. 1, p. 4-26, 2009.

\_\_\_\_\_. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. **Opera Botanica. Belgica**, n. 7, p. 33-50, 1996.

\_\_\_\_\_. Phylogeny of the Rubiaceae (Chiococceae) based on molecular and morphological data – Useful approaches for classification and comparative ecology. **Annals of Missouri Botanical Garden**, n. 79, p. 380-387, 1992.

BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. **Annals of Missouri Botanical Garden**, n. 82, p. 383-397, 1995.

BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, n. 6, p. 766-793, 2009.

BREMER, B.; JANSEN, R. K. Comparative restriction site mapping of chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within the Rubiaceae. **American Journal of Botany**, n. 78, p. 198-213, 1991.

- BREMER, B.; MANEN, J. F. Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 225, n. 1-4, p. 43-72, 2000.
- BREMER, B.; SXRUWE, L. Phylogeny of the Rubiaceae and the Loganiaceae: congruence or conflict between morphological and molecular data? **American Journal of Botany**, n. 79, p. 1171-1184, 1992.
- BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology**, n. 69, p. 55-60, 1990.
- BROCHINI, C. B. et al. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1293-1295, 1994.
- BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica e de Farmacognosia. Zaragoza/ES: Acribia., 1991.
- BRUNETON, J. Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales, 1993.
- CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M. B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 1, p. 33-37, 2003.
- CARBONEZI, C. A. et al. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcaloides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878-881, 2004.
- CARBONEZI, C. A. et al. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 781-785, 1999.
- CARDOSO, C. M. V; PROENA, S. L.; SAJO, M. G. Foliar anatomy of the subfamily Myrtoideae (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 2, p. 148-161, 2009.
- CARTY, M. F. The chlorophyll metabolite phytanic acid is a natural rexinoid-potential for treatment and prevention of diabetes. **Medical Hypothesis**, n. 56, p. 217-219, 2001.
- CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; OLIVEIRA FILHO, A. T. Composição, riqueza e heterogeneidade da flora arbórea da bacia do rio São João, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 929-940, 2008.
- CARVALHO, F. A. et al. Estrutura da comunidade arbórea da Floresta Atlântica de baixada periodicamente inundada na Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de

Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, p. 503-518, 2006.

CHARRIERE-LADREIX, Y.; DUMAS, C. Introduction à l'étude histochimique ultrastructurale des tannins, aglycones flavoniques et lignines. **Rapport** présenté à l'Assemblée générale du Groupe Polyphénols, Dijon, 1976.

CHAVES, O. et al. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 19526-19539, 2015.

CIC. História do café, 2009. Disponível em: <http://www.cicbr.org.br/cafe-historia.php>. Acesso em 04 mai. 2016.

CIDE. Índice de qualidade dos municípios verde. **Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2000.

CIMANGA, R. K. et al. Bioassay-Guided Isolation of Antimalarial Triterpenoid Acids from the Leaves of *Morinda lucida*. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 9, p. 677-681, 2006.

CLARKE, D. D. Fluoroacetate and fluorocitrate: Mechanism of action. **Neurochemical Research**, n. 16, v. 9, p. 1055-1058, 1991.

COELHO, C. P.; BARBOSA, A. A. A. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 403-413, 2003.

COELHO, E. G. et al. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazonas state. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 407-409, 2007.

COELHO, V. P. D. M.; AGRA, M. D. F.; BARBOSA, M. R. D. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

COOK, D. et al. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. **Toxicon**, v. 80, p. 9-16, 2014.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C. et al. Calcium gluconate and sodium succinate for therapy of sodium luoroacetate experimental intoxication in cats: Clinical and electrocardiographic evaluation. *Hum. Exp. Toxicology*, v. 25, n. 4, p. 175-182, 2006.

COUTINHO, L. M. Contribuição ao conhecimento da ecologia da floresta pluvial tropical. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras: Universidade de São Paulo. Botânica*, n. 18, p. 203-219, 1962.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 183-205, 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. J. *Natural Product*, n. 69, p. 488-498, 2006.

CRONQUIST, A. An integrated system of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, p. 1262, 1981.

CRUZ, A. R.; SILVA-GONÇALVES, C. da; NUNES-FREITAS, A. F. Estrutura e florística de comunidade arbórea em duas áreas The Atlantic Forest covered most of the Northern region of Rio de Janeiro state , being reduced , nowadays , of the forest fragments of this region . This study aimed to characterize the floristic. *Rodriguésia*, v. 64, n. 4, p. 791-805, 2013.

DAVID, R.; CARDE, J. P. 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 D258**, p. 1338-1340, 1964.

DA CUNHA, M. et al. Laticifer System of Chamaesyce Thymifolia. A Closed Host Environment for Trypanosomatids. *Biocell (Mendoza)*, Mendoza, v. 24, n. 2, p. 123-132, 2000.

DA SILVA, V. C.; DE CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). *Journal of Natural Medicines*, v. 62, n. 3, p. 356-357, 2008.

DE CANDOLLE, A.P. Rubiaceae. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Paris, v. 4, p. 341-622, 1930.

- DE MESQUITA, M. L. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 165-170, 2007.
- DE OLIVEIRA, A. A. P. et al. Chemical compounds isolated from *Talinum triangulare* (Portulacaceae). **Food Chemistry**, v. 160, p. 204-208, 2014.
- DE SANTOS, L.V. et al. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Mull. Arg. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 29, p. 1185-1187, 2001.
- DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum Didelphis marsupialis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1984.
- DELPRETE, P. G.; CORTÉS-B, R. A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. **Taxon**, v. 53, n. 2, p. 347-356, 2004.
- DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiaceae. In: A. Reis (ed.). Flora ilustrada Catarinense. **Herbário Barbosa Rodrigues**, Itajaí, v.1, p. 1-345, 2004.
- DELPRETE, P. G. Chemotaxonomy and macroclassification of Rubiaceae. Third International Rubiaceae Conference Rubiaceae (18-21 september), Leuven, Belgium. Program and Abstracts, p. 28, 2006.
- DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics , taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges Abstract The Rubiaceae is the fourth Angiosperm family in number of species in the World and in the Neotropics . Its overwhelming div. v. 63, n. 1, p. 101-128, 2012.
- DENNING, D. W. Echinocandins and pneumocandins--a new antifungal class with a novel mode of action. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 611-4, 1997.
- DESSEIN, S. et al. Hekistocarpa (Rubiaceae): A member of an emended tribe Virectarieae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 229, n. 1-2, p. 59-78, 2001.

DI CARLO, G. et al. Flavonoides: Old and New aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DICKISON, W. C. Integrative Plant Anatomy. **Academic Press, USA**, p. 533, 2000.

DICKISON, W. C. The basis of Angiosperms phylogeny: vegetative anatomy. **Annual Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 590-620, 1975.

DO NASCIMENTO, C. A. et al. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 61, n. 11, p. 1443-1446, 2006.

DO NASCIMENTO, C. A. et al. A tetrahydro  $\beta$ -carboline trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 6, p. 1104-1107, 2008.

DOS SANTOS, A.; HERMMAN, G. O Parque Nacional do Itatiaia. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável, p. 9-19, 2000.

DONDORP, A. M. et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DONFACK, A. R. N. et al. Two new anthraquinone dimers from the stem bark of *Pentas schimperi* (Rubiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 8, n. 1, p. 55-58, 2014.

DONGMO, A. B. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubrév. & Pellegr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 17-21, 2003.

DROGAT, N. et al. Antimicrobial silver nanoparticles generated on cellulose nanocrystals. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 4, p. 1557-1562, 2011.

DUARTE, A. F. S. Estudo fitoquímico, toxicidade e atividades biológicas: (antioxidante, antimicrobiana e alelopática) de cascas do caule de guettarda uruguensis cham. & schlttdl. Rubiaceae. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, 2012.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on

*Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DUNN, D. B.; SHARMA, G. K.; CAMPBELL, C. C. Stoflorestal patterns of dicotyledons and monocotyledons. **American Midland Naturalist**, n. 74, p. 185-195, 1965.

DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 204-215, 2011.

DÜSMAN, L. T. et al. Monoterpene indole alkaloids from *Palicourea crocea*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1886-1888, 2004.

EGAN, D. et al. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarinrelated compounds. **Drug Metabolism Reviews**, n. 22, v. 5, p. 503-529, 1990.

EL-SEEDI, H.R. Coumarins, benzoic acids and triterpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamer Quimica**, n. 27, p. 13-16, 1999.

ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. Tradução: Berta Lange de Morretes. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 231, 1974.

ENDT, D. V.; KIJNE, J.W.; MEMELINK, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulators? **Phytochemistry**, n. 61, p. 107-114, 2002.

ERKÖSE, G.; ERTURAN, Z. Oral *Candida* colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4+ T-lymphocyte count. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 485-490, 2007.

ESPINDOLA, L. S. et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

FAHN, A. Plant anatomy. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1990.

FARIA, E. O. et al. Quaternary b-carboline alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerem. **Phytochemistry Letters**, n. 3, p. 113-116, 2010.

FARIAS, F.M. et al. Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1138-1143, 2012.

FARIAS, F.M. et al. Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg.(Rubiaceae). **Phytomedicine**, v. 17, p. 289-291, 2010.

FARIAS, F. M. et al. Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus. **Fitoterapia**, v. 83, n. 6, p. 1138-1143, 2009.

FELFILI, J. M. et al. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa - MT. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 1, 2002.

FARR, D. F.; HOSSMAN, A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acessado em: 12/04/2016.

FIGUEIREDO, A. D. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 193-196, 2009.

FISCHER, D. B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemie**, n. 16, p. 92-96, 1968.

FORMAGIO, A. et al. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 745-757, 2014.

FORZZA, R. C. et al. Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>>. Acesso em 16 de maio 2015, 2010.

FUNDAÇÃO SOS FLORESTA ATLÂNTICA; INPE. Atlas dos Remanescentes Florestais da Floresta Atlântica - Período 1995-2000 - Relatório Parcial - Estado do Rio de Janeiro. Fundação SOS Floresta Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, p. 47, 2001.

FUNDAÇÃO SOS FLORESTA ATLÂNTICA; INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos remanescentes Florestais da Floresta Atlântica período 2005 –

2008. Relatório Parcial. **Fundação SOS Floresta Atlântica / Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, São Paulo, p. 156, 2008.

FUNDAÇÃO SOS FLORESTA ATLÂNTICA; INPE. Atlas dos Remanescentes Florestais da Floresta Atlântica - Período 2014-2015 - Estado do Rio de Janeiro. **Fundação SOS Floresta Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**. Acesso em: <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>, 01 de junho de 2016.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995. São Paulo, 2002.

FRAGOSO, V. et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, n. 22, p. 559-566, 2008.

GABE, M. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris, 1968.

GALLEGOS OLEA, R. S.; ROQUE, N. F. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.

GALINDO-LEAL; C. CÂMARA, I. G. Floresta Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. **Fundação SOS Floresta Atlântica/Conservação Internacional**, São Paulo/Belo Horizonte, p. 31-42, 2005.

GANTER, P.; JOLLÈS, G. Histologie normale ET pathologique. Gauthier-Villars, Paris, v. 1 e 2, 1970.

GARCIA, R. M. A. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 233-243, 2005.

GARCÍA, L. A.; TOBÓN, C. F.; MORA, C. E. Citotoxicidad de los componentes de *Palicourea ovalis*. Revista Colombia de ciencias quimico-farmacéuticas, n. 26, p. 55-57, 1997.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

- GATTUSO, M. et al. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 213-223, 2004.
- GERLACH, D. Botanische Mikrotechnik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, p. 311, 1984.
- GERMANO, M. P. et al. Hepatoprotective properties in the rat of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 729-734, 1999.
- GOEVARTS, R.; FRODIN, D. G.; RUHSAM, M. B. D. D. A. World Checklist and Bibliography of Rubiaceae| **Royal Botanic Gardens, Kew**. Disponível em: <<http://www.kew.org/science-conservation/research-data/science-directory/projects/world-checklist-and-bibliography>>. Acesso em: 3 maio. 2016, 2007.
- GOMES, D. M. S.; NEVES, L. D. J. Scanning electron microscopy of the leaf epidermis of *Merostachys* Spreng. (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, n. 23, p. 516-525, 2009.
- GOMES, D. M. S.; MANTOVANI, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Psychotria tenuinerves* Müll. Arg. e *Psychotria stenocalix* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, n. 38, p. 15-33, 1995.
- GONZAGA, A. D. et al. Toxicity of cassava manipueira (*Manihot esculenta* Crantz) and erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) to adults of *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2008.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. p. 267, 1996.
- GUEDES, F. B.; SEEHUSEN, S. E. Pagamentos por Serviços Ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, p. 128, 2011.
- GUÉRITTE-VOEGELEIN, F. et al. Alkaloids from *Psychotria oleoides* with Activity on Growth Hormone Release. **Journal of Natural Products**, v. 55, n 7. p 923 - 930, 1992.

- GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.
- GRUBER, C. W. et al. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. **The Plant cell**, v. 20, n. September, p. 2471-2483, 2008.
- HABERLANDT, G. Physiological plant anatomy. MacMillan, London, 1914.
- HALL, C. A.; CUPPETT, S. L. Structure-activities of natural antioxidants. **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**, p. 2-29, 1997.
- HAMMER, O. et al. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HAMERSKI, L. et al. Saponinas Triterpenicas de *Tocoyena* Mart.(Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.
- HAN, Y. S.; VAN DER HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, n. 3, p. 201-220, 2001.
- HARBORNE, J. B. phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. **Chapman and Hall**, London, 1984.
- HARE, C. L. On the taxonomic value of the anatomical structure of the vegetative organs of the dicotyledons. 5. The anatomy of the petiole and its taxonomic value. **Proceedings of the Linnean Society of London**, v. 155, p. 223-229, 1942.
- HARTMANN, T.; OBER, D. Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A (ed) Induced plant resistance to herbivory. **Springer**, New York, 2008.
- HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*, v. 34, n. 1, p.103-160, 1971.
- HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5-29, 2005.
- HEMINGWAY, S. R.; PHILIPSSON, J. D. Alkaloids of the Rubiaceae in Philipsson, J.D. et Zenk, M.H. - Indole and Biogenetically related alkaloids. Academic: London, cap.4, p. 63- 90, 1980.

- HENRIQUES, A. T. et al. N-b-D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, n. 65, p. 449-454, 2004.
- HOET, S. et al. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. **Natural product reports**, v. 21, n. 3, p. 353-364, 2004.
- HÖFLING, J. F. et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.
- INOUYE, H. et al. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid Glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.
- IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 809-823, 2010.
- JANGDE, C. R.; BANSOD, K. V. Efficacy of *Gardenia gummifera* in roundworm infection in goats. **Indian Veterinary Journal**, v. 81, n. 3, p. 344-344, 2004.
- JANNIC, V. et al. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 838-843, 1999.
- JANSEN, S. et al. A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae. **Annals of Botany**, n. 91, p. 657-663, 2003.
- JAYASINGHE, U. L. B. et al. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 424-427, 2002.
- JENSEN, S. R. in "Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids", J.B. Harborne and F.A Thomas-Barberan, eds. (Clarendon Press, Oxford), p. 133, 1991.
- JOHANSEN, D. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, p. 52, 1940.
- JOLY, C.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytol**, v. 204, p. 459-473, 2014.

- KALA, M. J.; SORIS, T.; MOHAN, V. R. Gas chromatography-Mass Spectrometry determination of bioactive components of *Eugenia floccosa*. Bedd. (Myrtaceae), **International Journal of Pharma and Biosciences**, n. 3, p. 277-282, 2012.
- KAMIYA, H.; ZHANG, W.; SIMA, A. A. F. C-peptide prevents nociceptive sensory neuropathy in type 1 diabetes. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 6, p. 827-835, 2004.
- KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 551-556, 2002.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, n. 27, p. 137-138, 1965.
- KATO, L. et al. Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (kunth) steyererm. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 355-360, 2012.
- KEMMERLING, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: Combined Effects of Fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-Methyltetrahydro- $\beta$ -carboline. **Zeitschrift für Naturforschung**, n. 51, p. 59-64, 1996.
- KERBER, V, A. et al. Three new monoterpene indole alkaloids from *Psychotria umbellata* Thonn. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 4798 - 4800, 2014.
- KIM, C. et al. Esculetin , a Ccumarin Ddrivative, inhibits aldose reductase activity in vitro and cataractogenesis in galactose-Fed Rats. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 178-183, 2016.
- KIM, I. T. et al. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis*. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 607-15, 2005.
- KLINGENBERG, C. P. et al. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: A multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 1, p. 115-129, 2012.
- KO, J. H.; HAN, K. H. Arabidopsis whole-transcriptome profiling defines the features of coordinated regulations that occur during secondary growth. **Plant Molecular Biology**, n. 55, p. 433-453, 2004.
- KOCSIS, M.; DARK, J.; BORHIDI, A. Comparative leaf anatomy and morphology of

some neotropical *Rondeletia* (Rubiaceae) species. **Plant Systematic and Evolution**, n. 248, p. 205-218, 2004.

KOIKE, K. et al. A. New cytotoxic diterpenes from *Rondeletia panamensis* (Rubiaceae). **Tetrahedron**, v. 36, n. 9, p. 1167-1172, 1980.

KOK, S. H et al. Esculetin enhances Trail-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral cancer SAS cells. **Oral Oncology**, 2009.

KÖPPEN, W. Climatologia. Fondo de Cultura Econômica, México, 1948.

KOEHBACH, J. et al. Cyclotide discovery in Gentianales revisited identification and characterization of cyclic cystine-knot peptides and their phylogenetic distribution in Rubiaceae plants. **Peptide Science**, v. 100, n. 5, p. 438-452, 2013.

KREBS, H. C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by <sup>19</sup>F-NMR. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 909-913, 1994.

KULANDAI THERESE, N.; TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. GC-MS analysis of bioactive constituents of *Hedyotis leschenaultiana* dc ( Rubiaceae ). **International journal of applied biology and pharmaceutical technology**, v. 3, n. 4, p. 159-164, 2012.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism chemicals of diverse structure players in the interaction between signal compounds involved in and evolved role in the life cycle of A. **Society**, v. 125, n. January, p. 58-60, 2001.

LEBRINI, M.; ROBERT, F.; ROOS, C. Alkaloids Extract from *Palicourea guianensis* Plant as Corrosion Inhibitor for C38 Steel in 1 M Hydrochloric Acid Medium. **International Journal Electrochemical Science**, n. 6, p. 847 - 859, 2011.

LEE, S. T. et al. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 791-796, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. Cox MM. **Princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEISTNER, E. Biosynthesis of chorismate-derived quinones in plant cell cultures. In: Neumann KH, Barz W & Reinhard E (eds) Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, **Springer-Verlag**, Berlin, New York, p. 215-224, 1985.

LEISTNER, E. Biosynthesis of Plant Quinones. In: Conn EE (ed) The Biochemistry Of Plants, **Academic Press**, London, v. 7, p. 403-423, 1981.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* laboratory – Blackwell Publishing, **Oxford**, UK; 2006.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. How many species are there in Brazil? **Conservation Biology**, v. 19, p. 619-624, 2005.

LI, X. et al. Psychotripine: A new trimeric pyrroloindoline derivative from *Psychotria pilifera*. **Organic letters**, v 13, n 21, p. 5896-5899, 2011.

LIU, Y. et al. Two novel dimeric indole alkaloids from the leaves and twigs of *Psychotria henryi*. **Fitoterapia** 86 (2013) 178–182.

LIN, W. L. et al. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. **Archives of Toxicology**, n. 74, p. 467- 472, 2000.

LOPES, S. et al. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1187-1195, 2004.

LOPES, S. O.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 259–264, 2000.

LOPEZ-MEYER, M.; NESSLER, C. L. Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress. **Plant Journal**, 1997.

LU, H. et al. A new iridoid glycoside from the root of *Psychotria rubra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 57, p. 133-136, 2014.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. Statistical Ecology. A primer on methods and computing. New York, John Wiley & Sons, 1988.

LUGINBUHL, S. de A class Project for PP728 Soil borne Pathogens, Fall 2010. Disponível em: <[http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium\\_solani.htm](http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm)>. Acessado em 11/04/2016.

LUO, S. et al. A Review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. **Biomaterials**, n. 32, p. 7127-7138, 2011.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser, 1972.

MACE, M. E. HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, n. 52, p. 2423-2426, 1974.

MACEDO, E. G. et al. Anatomia e arquitetura foliar de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) Espécie da Várzea Amazônica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 1, n. 1, p. 19-43, 2005.

MACHADO, A. D. O. et al. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 686-696, 2010.

MACHADO, R. D.; BARROS, C. F. Epidermis and epicuticular waxes of *Syagrus coronata* leaflets. **Canadian Journal of Botany**, n. 73, p. 1947-1952, 1995.

MCLEAN, R. C.; COOK, W. R. L. Plant Science Formulae. London, Macmillan & Company Ltd, 1958.

MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, n. 23, p. 99-108, 1948.

MANTOVANI, W. A dinâmica da floresta na encosta atlântica. Anais do II simpósio de ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: estrutura, função e manejo. **ACIESP**, São Paulo, v.1, p. 304-313, 1990.

MANTOVANI, A. et al. Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Müll. Arg. and *R. macrophylla* Benth. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 9, p. 247-261, 1995.

MARTÍNEZ-CABRERA, D.; TERRAZAS, T.; OCHOTERENA, H. Foliar and Petiole Anatomy of Tribe Hamelieae and Other Rubiaceae 1. **Annals Missouri Botanic Garden**, n. 96, p. 133-145, 2009.

- MARQUES, J. B. C. et al. Comparative wood anatomy of species of *Psychotria* L. ( Rubiaceae ) in Atlantic Rainforest remnants of Rio de Janeiro State , Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 3, p. 433-444, 2015.
- MARTÍNEZ-CABRERA, D.; TERRAZAS, T.; OCHOTERENA, H. Foliar and petiole anatomy of tribe hamelieae and Other Rubiaceae 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, n. 1, p. 133-145, 2009.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.
- MATSUDA, Y.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H. First total synthesis of trimeric indole alkaloid, psychotrimine. **Organic Letters**, v. 10, n. 1, p. 125-128, 2008.
- MAYA, J. D., et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, **Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-20, 2007.
- MAYO, S. J.; FEVEREIRO, V. P. B. Floresta de Pau- Ferro A pilot study of the Brejo Forest of Paraiba, Brazil. Bentham Moxon Trust, Royal Botanic Gardens, **Kew**, London, p. 29, 1982.
- MENDES, M. A. S. et al. Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI/**Embrapa-Cenargen**, 1998. Brasília, p. 555, 1998.
- MENDES, S. L.; PADOVAN, M. P. A Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Tereza Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, n. 11/12, p. 7-34, 2000.
- MENDONÇA, L. B.; DOS ANJOS, L. Flower morphology, nectar features, and hummingbird visitation to *Palicourea crocea* (Rubiaceae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 45-57, 2006.
- MESQUITA, D. W. O. et al. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Campinas, v.17, n.4, p.604-613, 2015.

- METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of dicotyledons. Oxford: Clarendon Press. v. 2, 1989.
- METCALF, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. 2 ed, 1988.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. **Oxford, Clarendon Press**, v. II, p. 297, 1985.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon, 1950.
- METZGER, J. P. et al. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1166-1177, 2009.
- MITTERMEIER, R. A. et al. Hotspots revisited. **Cemex**, Mexico City, p. 392, 2004.
- MONTANARI JR., I. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas, 2002. Disponível no site: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2016.
- MORAES-MOREAU, R. L. et al. Chemical and biological demonstration of the presence of mono-luoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 28, p. 685 - 692, 1995.
- MORAES, T. M. D. S. et al. Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 964–970, 2011.
- MORAES, T. M. da S. et al. Leaf blade anatomy and ultrastructure of six *Simira* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rain Forest, Brazil. **Biocell**, v. 33, n. 3, p. 155-165, 2009.
- MORELLATO, L. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 786-792, 2000.
- MORENO, B. P. et al. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014.

- MORIM DE LIMA, M. P.; GUEDES-BRUNI, R. R. Reserva ecológica de Macaé de Cima. Nova Friburgo – RJ. Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 1, 1994.
- MOURA, L. T. S.; MARUO, V. M. Aspectos farmacológicos e toxicológicos de *Psychotria colorata*. n. Dmv, 2014.
- MUHAMMAD, I. et al. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. **Journal Natural Products**, v 66, p. 962-967, 2003.
- MURRAY-SMITH, C. et al. Plant diversity hotspots in the Atlantic coastal forests of Brazil. **Conservation Biology**, v. 23, n. 1, p. 151-163, 2009.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NAGASAMPAGI, B. A. et al. Sterols of coffee. **Phytochemistry**, v. 10, n. 5, p. 1101-1107, 1971.
- NARINE, L. L.; MAXWELL, A. R. Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*. **Phytochemistry Letters**, n. 2, p. 34-36, 2009.
- NASCIMENTO, N. C. et al. Accumulation of brachycerine, an antioxidant glucosidic indole alkaloid, is induced by abscisic acid, heavy metal, and osmotic stress in leaves of *Psychotria brachyceras*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 33-40, 2013.
- NASCIMENTO, N. C. et al. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 728-734, 2007.
- NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. Characterisation and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annals of Botany**, n. 79, p. 667-677, 1997.
- NETSCHER, T. Synthesis of Vitamin E. **Vitamin and Hormones**, n. 76, p. 155- 2002, 2007.
- NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. J. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. **Systematic Botany**, v. 24, n. 1, p. 22, 1999.

- NEVES, C. A estória do café. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do café, p 52, 1974.
- NOGUEIRA, V. A. et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 823-838, 2011.
- NOIREAU, F. et al. Some considerations about the ecology of Triatominae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 431-436, 2005.
- NOMURA, T.; QUESADA, A. L.; KUTCHAN, T. M. The New  $\beta$ -D-Glucosidase in Terpenoid-Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis in *Psychotria ipecacuanha*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 34650-34659, 2008.
- NOVÁK L., MISUSTOVÁ J.; HOSEK B. Course of respiratory exchange and body temperature in mice after repeated administration of luor acetate: An indicator of aconitase activity *in vivo*. **Physiol Bohemoslo**, v n. 21, p. 53-61, 1972.
- OCAMPO, R.; SACHS, J.; REPETA, D. Isolation and structure determination of the unstable 13, 17, 3-Cyclophosphoribide a enol from recent sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 63, n. 22, p. 3743-3749, 1999.
- OGBUNUGAFOR, H. A. O. et al. Mitragyna ciliata and its trypanocidal activity. **Journal of Biotechnology**, v. 6, n. October, p. 2310-2313, 2007.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, n. 59, p. 368-373, 1964.
- OLEA, G. R. S.; ROQUE, N. F. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.
- OLIVEIRA, A. M.; LEMOS R. P. L.; CONSERVA, L. M.  $\beta$ -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 339-341, 2013.
- OLIVEIRA, C. M. C. DE et al. Estudo comparativo da toxicidade de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 27-30, 2004.
- OLIVEIRA, M. D. E. C. et al. Detection of anthraquinones and identification of 1, 4-

naphthohydroquinone in cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides* ( Cham .) Müll. Arg . ( Rubiaceae ). **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 167-172, 2007.

OLIVEIRA, R. R. et al. Significado ecológico da orientação de encostas no maciço da Tijuca, Rio de Janeiro. **Oecologia Brasiliensis**, n. 1, p. 523-541, 1995.

OLIVEIRA-FILHO, A.; FONTES, M. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate<sup>1</sup>. **Biotropica**, v. 32, n. March 1999, p. 793–810, 2000.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.. The global 200: Priority ecoregions for global conservation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, n. 89, 199-224, 2002.

PAPPAS, P. G. The role of azoles in the treatment of invasive mycoses: review of the infectious diseases society of *America guidelines*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, p. 1-13, 2011.

PARANHOS, J. T. Organ-specific and environmental control of accumulation of psychollatine, a major indole alkaloid glucoside from *Psychotria umbellata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 37, p. 707-715, 2009.

PASSOS, C. S. et al. Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from *Psychotria suterella* and *Psychotria laciniata*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 611-618, 2013.

PAUL, J. H. A.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Novel bis(monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. **Journal Natural Products**, v. 66, p. 752-754, 2003.

PEIXOTO, T. C. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica mono\_luoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 219-328, 2012.

PELEGRIN, C. M. G. DE LONGHI-WAGNER, H. M.; OLIVEIRA, P. L. DE. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de espécies do Complexo Briza L. (Poaceae: Pooideae: Poeae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 666-680, 2009.

PEREIRA, Z. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). **Revista Árvore**, v. 27, n. 6, p.

759–767, 2003.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Imprensa Nacional Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, v. 2, 1984.

PIMENTA, A. A. T. et al. Unusual monoterpene indole alkaloids from *Psychotria stachyoides* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 38, p. 846-849, 2010.

PINTO L. F. et al. Effects of high diluted solutions of *Palicourea marcgravii* St Hill in rats poisoned by aqueous extracts of this plant. **International Journal of High Dilution Research**, Guaratinguetá, v. 7 n. 25, p. 193-198, 2008.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93–98, jun. 2001.

PRABAKARAN, D. ASHOKKUMAR, N. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. **Biochimie**, n. 95, p. 366- 373, 2013.

PRAVEEN KUMAR, P.; KUMARAVEL. S.; LALITHA, C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*, **African Journal of Biochemistry Research**, n. 4, p. 191-195, 2010.

QUINET, A. et al. Floresta Atlântica, 500 anos. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, (CD-ROM), 2000.

QUINTEIRO, M. M. C. et al. Anatomia foliar de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. (Rubiaceae). **Revista Universidade Rural**, n. 26, p. 30-41, 2006.

RAMALINGUM; NELVANA; MAHOMOODALLY, M. F. *Vangueria madagascariensis* J.F. Gmelin (Rubiaceae) - an under-utilised African traditional medicinal food plant with potential applications. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 45, 2014.

RASOLONJANAHARY, R. et al. Psycholeine, a natural alkaloid extracted from *Psychotria oleoides*, acts as a weak antagonist of somatostatin. **European Journal of Pharmacology**, n. 285, p. 19-23, 1995.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-

291, 2012.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G. et al. Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): Evolution of schizocarps in Psychotria and origins of bacterial leaf nodules of the Malagasy species. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 7, p. 1102-1126, 2014.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; RYDIN, C.; BREMER, B. Evolution and trends in the Psychotrieae alliance (Rubiaceae) A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 1, p. 207-223, 2008.

REYNOLDS E S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, n. 17, p. 208-12, 1963.

REPENTIGNY, L. DE; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Society**, v. 17, n. 4, p. 729-759, 2004.

REZENDE, V. L. et al. Tree species composition and richness along altitudinal gradients as a tool for conservation decisions: the case of Atlantic semideciduous forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2149-2163, 2015.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: Zachos FE, Habel JC (eds) Biodiversity hotspots. **Springer**, Heidelberg, p. 405-434, 2011.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RIPPERGER, H. Chimonathinaus *Palicourea domingensis*. **Pharmazie, Eschborn**, v.37, n.12, p. 867, 1982.

RIVAS, P. et al. Effects of some  $\beta$ -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 27-31, 1999.

RIVIER, L.; LINDGREN, J.E. "Ayahuasca", the South American hallucinogenic drink:

an ethnobotanical and chemical investigation. **Economy Botany**, n. 26, p. 101-129, 1972.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, n. 3, p. 1-271, 1988.

ROBBRECHT, E.; MANEN, J.-F. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF*. **Systematics and Geography of Plants**, v. 76, n. 1, p. 85-146, 2006.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROBERTS E. A. H, CARTWRIGHT R. A, OLDSCHOOL M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science Food and Agriculture**. n. 8, p. 72-80, 1957.

RODRIGUES, R.R. et al. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de floresta estacional mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiá, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 12, p. 71-84, 1989.

RODRIGUES, K. et al. Antifungal activity of Brazilian amazon plantas extracts against some species of *Candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 5, p. 445-453, 2014.

RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of some cerrado plants extracts agains *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, M. I. A. FURLAN, A.. Livro de resumos do 54º Congresso Nacional de Botânica 3ª Reunião Amazônica de Botânica Local do Evento: Universidade da Amazonia UNAM, R0165-1, 2003.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. A. biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Floresta Atlântica. **Editora RiMa**, São Carlos, p. 160, 2003.

- ROSA, E. A. DA et al. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.
- ROVA, J. H. E. et al. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 1, p. 145–159, 2002.
- ROVA, J. H. E. ANDERSSON, L. DELPRETE, P. G. ALBERT, V. A. Macrophylogeny of the Rubiaceae from trnL-F sequence data. Abstract of the AIBS meetings, Canada. **American Journal of Botany**, n. 84 (supplement), p. 227, 1997.
- SALUDES, J. P.; GARSON, M. J.; FRANZBLAU, S. G.; AGUINALDO, A. M. Antitubercular constituents from hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 683-685, 2002.
- SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.
- SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 73-81, 2000.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2-13, 2015.
- SANTOS, L. S. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do campimmarandu e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 531-538, 2008.
- SANTOS, M. I. S.; LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C. Metodologia em Quimiosistemática. In: Kaplan, M.A.C.; Abreu, H.S.; Lima, H.R.P.; Soares, G.L.G. (Eds), Abordagem quimiosistemática e evolução química de fanerógamas. EDUR UFRRJ, RJ, Brasil, p.39-50, 2010.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. **Journal of oral science**, v. 52, n. 2, p. 177-185, 2010.

SASS, J. E. Botanical microtechnique. 2° ed. Ames, The Iowa State College Press, p. 391, 1951.

SCAFARO, A. P. et al. Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness. **Plant, Cell & Environment**, n. 34, p. 1999-2008, 2011.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2319-2331, 2015.

SCHUMANN, K. et al. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig: **Engelmann**, v. 4, n. 4, p. 1-156, 1891.

SCIO, E. et al. New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **Journal Natural Products**, v. 66, p. 634-637, 2003.

SILVA, W. C. et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 189-194, 2011.

SILVA M. F. G.; GOTTLIEB O. R.; EHRENDORFER F. Chemotaxonomy of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. **Plant Systematic and Ecology**, n. 161, p. 97-134, 1988.

SILVA, I. P. et al. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 229 - 233, 2008.

SHIMIZU et al. Morning glory systemically accumulates scopoletin and scopolin after interaction with *Fusarium oxysporum* Z. *Naturforsch*, p. 83-90, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, 2004.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre, 2007.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, **Numerical taxonomy**, p. 573, 1973.

SOARES, P. R. O. *In Vitro* Antiproliferative Effects of the Indole Alkaloid Vallesiachotamine on Human Melanoma Cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 3, p. 565-571, 2012.

SOARES G. L. G. Polarizações da Química Flavonoídica em Linhagens Vegetais. Tese de Douramento, Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Núcleo de Pesquisa de Produtos**. Rio de Janeiro. 1996.

SOLEREDER, H. Ein beitrage zur anatomischen charakteristik and zur systematic der Rubiaceen. Bulletin de l'Herbier Boissier, n. 1, p. 167-183, 1893.

SOLEREDER, H. Systematic anatomy of dicotyledons. Oxford, Claredon Press.,IV 1182, 1908.

SOLÍS, P. N. et al. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 963-969, 1997.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections , Causes , Targets , and Resistance Mechanisms : Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, p. 13, 2013.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7, 2004.

STEHMANN, J. R. et al. Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 516 p, 2009.

STUART, K. L.; Woo-Ming, R. B. *Palicourea alkaloids*: the structurr of palinine. **Tetrahedron titters HO**, v. 4, p. 3853 - 3856, 1974.

SU, B. N. et al. Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 293-302, 2003.

SUBRAMANIAM, S. R. ELLIS, E. M. Esculetin-induced protec- tion of human

hepatoma HepG2 cells against hydrogen peroxide is associated with the Nrf2-dependent induction of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 gene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, n. 250, p. 130-13, 2011.

SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 275-277, 2003.

SVENDSEN, A. B.; VERPOOTE, R. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1983.

TAN, M. A.; EUSEBIO, J. A.; ALEJANDRO, G. J. D. Chemotaxonomic implications of the absence of alkaloids in *Psychotria gitingensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 20-22, 2012.

TAKAYAMA, H. et al. New Type of Trimeric and Pentameric Indole Alkaloids from *Psychotria rostrata*. **Organic letters**, v. 6, n. 17, p. 2945-2948, 2004 .

TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) in the West Indies, Moscosoa, v. 7, p. 201-241, 1993.

TAYLOR, C. M.; GARDEN, B.; TAYLOR, C. M. Conspectus of the Genus *Palicourea* ( Rubiaceae : *Psychotrieae* ) with the Description of Some New Species from Ecuador and Colombia. v. 84, n. 2, p. 224-262, 1997.

TAYLOR C., M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p. 549-616, 2007.

TAYLOR, C. M.; LORENCE, D. H.; GEREAU, R. E. Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XXV: The Nocturnally Flowering *Psychotria domingensis*–*Coussarea hondensis* Group Plus Three Other Mesoamerican *Psychotria* species Transfer to *Palicourea*. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 20, n. 4, p. 481-492, 2010.

TAYLOR, C. M. et al. Rubiacearum Americanarum Magna Hama pars XXVIII: new taxa, new combinations, new names, and lectotypification for several species found in Mexico and Central America. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 21, n. 1, p. 133-148, 2011.

TAYLOR, C. M.; GEREAU, R. E. The Genus *Carapichea* (Rubiaceae, Psychotrieae).

**Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, n. 1, p. 100-127, 2013.

TAVARES, E. S. VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Coussarea meridionalis* (Vell.) Muel. Arg. e *Coussarea graciliflora* Benth. & Hook (Rubiaceae). **Boletim do Herbário Bradeanum** (Bradea), n. 39, p. 320-330, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

TELLERIA, J. et al. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental parasitology**, v. 114, n. 4, p. 279-88, 2006.

THE PLANT LIST, Version 1. Publicado na internete. (<http://www.theplantlist.org/>). Acesso em 8 de Abril de 2014. 2010.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. E.; SILVA, M. F. Plantas tóxicas da Amazônia. Manaus: **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA**, p. 95, 1979.

TOKARNIA, C. H. et al. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em eqüinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 13, n. 3/4, p. 67-72, 1993.

TOMÁS, M. et al. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: Quantitative limitations and scaling up by models. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 8, p. 2269-2281, 2013.

TOMAZ, A. C. D. A; NOGUEIRA, R. B. S. S.; SERA, D. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham.&Schltdl Steud.(Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. December 2007, p. 47-52, 2008.

TORRENT, M. et al. Antimicrobial Peptide Action on Parasites. **Current Drug Targets**, v. 13, n. March 2016, p. 1138-1147, 2012.

TOURE, H. et al. Pharmacological investigation of alkaloids from leaves of *Mitragyna inermis* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, p. 54: 59-62, 1996.

TOURÉ, A. et al. *In vitro* antifungal activity of the soap formulation of the hexane leaf extract of morinda morindoides (morinda; rubiaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 237-241, 2010.

TYLER, K.; OLSON, C.; ENGMAN, D. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi*.

**American Trypanosomiasis**, v. 7, p. 1-11, 2002.

TREVISAN, L. M. V. A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae. 52 f. **Tese** (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.

UESATO, S. et al. Intermediacy of 8-epiiridodial in the biosynthesis of iridoide glucosides by *Gardenia jasminoides* cell cultures. **Phytochemistry**, New York, v. 25, n. 10, p. 2309-14, 1986.

UESATO, S. S.; MATSUDA, H.; INOUE. "Studies on monoterpene glucosides and related natural-products. 52. mechanism for iridane skeleton formation from acyclic monoterpenes in the biosynthesis of secoiridoid glucosides and indole alkaloids." **yakugaku zasshi-journal of the pharmaceutical society of japan**, n. 104, v. 12, p. 1232-1243, 1984.

VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. The Invisible Beauty of the Biodiversity: The Rubiaceae Taxon. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 296–310, 2016.

VAN VOORHIS, W. C. et al. *Trypanosoma cruzi* Inactivation in Human Platelet Concentrates and Plasma by Psoralen (Amotosalen HCl) and Long-Wavelength UV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 475-479, 2003.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M.  $\beta$ -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1485-1489, 1999.

VEIGA-SANTOS, P. et al. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 349-356, 2013.

VELOSO, H. P.; FILHO, A. L. R. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. **Rio de Janeiro**, p. 60-97, 1991.

VENCATO, I. et al. Calycanthine monohydrate. **Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online**, v. 60, n. 6, p. 1023-1025, 2004.

VEIGA-SANTOS, P. et al. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, n. 137, p. 1661-1670, 2010.

VERDCOURT, W. G. Remarks on the classification of the Rubiaceae. **Bulletin du Jardim Botanique** de L'Etat Bruxellas, v. 28, n. 3, p. 209-290, 1958.

VERMES, B.; WAGNER, H. Synthesis and structure proof of morindone 6-Ogentiobioside from *Morinda tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2493-2494, 1980.

VEROTTA, L. et al. Synthesis and antinociceptive activity of chimonanthines and pyrrolidinoindoline-type alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 2133-2142, 2002.

VERROTTA, L. et al. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, v.61, p.392-396, 1998.

VIEIRA, R. C. DELPRETE, P. G. LEITÃO, G. G. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, n. 88, p. 2151-2156, 2001.

VIEIRA, R. C. GOMES, D. M. S. Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltld.) Wawra, *P. leiocarpa* Cham. & Schltld., *P. stenocalix* Müll. Arg. e *P. tenuinervis* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, n. 9, p. 263-270, 1995.

VIEIRA, R. C. GOMES, D. M. S. FERRAZ, C. L. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *Psychotria leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). **Hoehnea**, v. 19, n. 1/2, p. 185-195, 1992.

VITARELLI, N. G. Morfoanatomia foliar da reófito facultativa *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). Florianópolis. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 76, 2008.

WAGNER, G. J.; WANG, E.; SHEPHERD, R. W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. **Annals of Botany**, n. 93, p. 3-11, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. 2<sup>nd</sup> edition. **Springer** . Berlin, p. 368, 2001.

WANG, C.J. et al. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters**, v. 183, p. 163-168, 2002.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative medicine review**, v. 6, n. 6, p. 567-580, 2001.

WILKINSON, H. P. The plant surface In Metcalfe, C.R. & Chalk, L. (eds.) *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press v. 1, p. 97-165, 1979.

WYLIE, R. B. Principles of foliar organization shown by sunshade leaves from ten species of deciduous dicotyledon trees. *American Journal of Botany*, n. 38, p. 355-361, 1951.

WONG, K. Y. et al. Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria* sps (Rubiaceae). **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 4, p. 302-311, 2015.

YANG W. et al. Chemical Constituents from *Cichorium glandulosum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, n. 3, p. 193-195, 2009.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reaction of alkaloids and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharantus roseus* (Apocynaceae). **American Journal of Botany**, n. 63, p. 1167-1173, 1976.

YOSHIHIRO, I. et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, terpenone and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1770-1774, 2005.

YOUNG, M. C. M. et al. Triterpenes and Saponins from *Rudgea viburnioides*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 936-938, 1998.

YOUNG, M. C. M. et al. Chemosystematic markers of Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, n. 7, p. 205-212, 1996.

YOUNG, M. et al. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla* M. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.

ZIEGLER, J. J.; FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual review of plant biology**, v. 59, n. 1, p. 735-69, 2008.

Zhou, H. A new dimeric alkaloid from the leaf of *Psychotria calocarpa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, 2010.