

# MORFO-ANATOMIA E HISTOQUÍMICA FOLIAR DE *Azadirachta indica* A. JUSS (*Neem*) (MELIACEAE), CULTIVADAS EM GOIÁS

Soraia Carvalho Amede<sup>1</sup>  
alva Graciano- Ribeiro<sup>2</sup>  
Maria Helena Rezende<sup>3</sup>  
Maria Tereza Faria<sup>4</sup>

## RESUMO

O *Neem*, *Azadirachta indica* A. Juss é uma árvore da família Meliaceae, originária da Índia. Nessas regiões o “*Neem*”, é considerado uma planta medicinal de relevante importância pelos seus efeitos positivos junto à saúde das plantações, animais e do próprio homem. Muitos compostos ativos já foram isolados de *A. indica* sendo que o liminóide azadiractina encontrada nas sementes, usado principalmente como repelente e inseticida. Foram registrados na literatura especializada vários trabalhos do ponto de vista fitoquímico com a espécie, no entanto nenhuma literatura foi encontrada a respeito de estruturas anatômicas e estudo histoquímico desta espécie cultivada em Goiás. Este estudo teve por objetivo levantar caracteres morfo-anatômico e histoquímico das folhas. Para confecção de lâminas e histoquímica foram utilizadas técnicas usuais de anatomia vegetal. Anatomicamente observou-se que *A. indica*, apresenta epiderme uniestratificada, cutícula espessa, presença tricomas glandulares peltados e raros toctores unicelulares em ambas as faces, hipoestomatica com estômatos predominantemente anomocíticos. Mesófilo dorsiventral, bordo arredondado, a nervura principal apresenta formato biconvexo, com maior proeminência na abaxial, o feixe vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto. Raque e pecíolo apresentam início crescimento secundário, o pecíolulo possui duas pequenas expansões laminares na face adaxial. Presença de grande quantidade de idioblastos contendo drusas e cristais de oxalato de cálcio. Na análise histoquímica: presença de compostos lipofílicos e fenólicos, amido em praticamente todos os tecidos da lâmina foliar tricomas toctores e de alguns glandulares. Os dados estruturais apresentados neste estudo de *A. indicam* são compatíveis com os relatados para as Meliaceae e contribuem para o conhecimento dessa espécie, pouco investigada sob o ponto de vista morfo-anatômico e histoquímico. Os dados obtidos além de importantes como fonte de conhecimento dessa espécie, poderão ajudar na taxonomia do grupo, bem como compreender as estratégias de adaptação da espécie em Goiás.

**Palavras- chave:** *azadiractina*, tricomas toctores e glandulares, compostos lipofílicos

---

<sup>1</sup> Aluno do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura- Faculdade Araguaia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade

<sup>3</sup> Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade; Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica

<sup>4</sup> Professora Titular do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura- Faculdade Araguaia; Professor orientador do Curso Especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino de Biologia (ETAEB)- UFG.

## INTRODUÇÃO

*Azadirachta indica* A. Juss é uma espécie de árvore pertencente a família Meliaceae. Essa família compreende 50 gêneros e cerca de 600 espécies, possui distribuição pantropical (SOUZA; LORENZI, 2012). No Brasil ocorrem seis gêneros e cerca de 80 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012).

As Meliaceae são conhecidas por conter uma variedade de compostos descritos como inseticidas (NAKATANI *et al.*, 2004). Popularmente conhecida como *Neem* ou Amargosa, é uma árvore originária da Índia, sendo nativa da região de Burna e das zonas áridas do sub-indiano e sudoeste asiático. Nessas regiões o *Neem*, é considerado uma planta medicinal de relevante importância pelos seus efeitos positivos junto à saúde das plantações, animais e do próprio homem (VIEGAS, 2003).

*Azadirachta indica* possui atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (ISMAM *et al.*, 1990; HARIKRISHMAN *et al.*, 2003), antidiabética e anti-inflamatória (CHATTOGRADHYAY, 1997), antisséptica, contra doenças de pele (MARTINEZ, 2002; WENKALER *et al.*, 2007), antiúlcera (BANDYOPADLYAY *et al.*, 2004) e antitumoral (DASGUPTA *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2006).

Na Índia onde a sua população completou um bilhão de habitantes, estudos já indicaram que *A. indica*, tem também importante atividade espermicida, e atua eficientemente como contraceptivo vaginal (RIAR *et al.*, 1990; SINHA *et al.*, 1984).

Muitos compostos ativos já foram isolados da árvore, sendo que o liminóide azadiractina, encontrada principalmente nas sementes, é considerada o composto mais potente e é muito eficiente à postura de ovos dos insetos, interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise, apresentando, ainda, atividade fago inibidora, além de antialimentar, repelente e inseticida (HOWATT, 1994; MARTINEZ, 2002; SIMÕES *et al.*, 2007). Vários estudos estão disponíveis avaliando a eficácia do *Neem* no controle de insetos, bactérias, fungos e nematoides (KOUL *et al.*, 1990).

Estudos recentes confirmaram o uso do extrato de *Neem* na inibição da produção da aflatoxina (ALLAMEH *et al.*, 2002; RAZZAGHI-ABYANEH *et al.*, 2005).

No estudo sistemático das plantas é necessário observar as características morfológicas externas e anatômicas, além das características embrionárias, químicas e genéticas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). As características morfológicas externas e internas

podem auxiliar na classificação de uma espécie vegetal em qualquer nível hierárquico (BEZERRA; FERNANDES, 1994).

A utilização da anatomia na sistemática ocorre há cerca de 150 anos e é útil tanto para a identificação prática quanto para a caracterização das relações filogenéticas entre as plantas (JUDD *et al.*, 1999). Metcalfe & Chalk (1983), afirmam que, associada aos aspectos ecológicos, pode ainda fornecer subsídios valiosos para o estudo de uma determinada espécie. Também pode auxiliar no controle da qualidade da matéria prima vegetal, bem como em pesquisas em outras áreas afins (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Como exposto acima, foram registrados na literatura especializada vários trabalhos do ponto de vista fitoquímico com a espécie *A. indica*, no entanto nenhuma literatura foi encontrada a respeito de estruturas anatômicas e estudo histoquímico desta espécie cultivada em Goiás. Assim, nesse trabalho propõe-se o estudo de *A. indica* sob o ponto de vista morfo-anatomico e histoquímico. Os dados obtidos além de importantes como fonte de conhecimento dessa espécie, poderão ajudar na taxonomia do grupo, bem como compreender as estratégias de adaptação da espécie em Goiás.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Vegetal*

A espécie utilizada neste estudo foi coletada na Embrapa Arroz e Feijão – Rodovia GO-462, km 12 Zona Rural C. P. 179 75375-000- Santo Antônio de Goiás, GO.

A espécie foi identificada pelo Dr. Belmiro Pereira das Neves (linha de pesquisa Entomologia, Sistema agroflorestal autossustentável, com ênfase ao cultivo, utilização e manejo do *neem* indiano). Pesquisador Embrapa.

### *Caracterização morfológica das espécies*

A descrição morfológica inicial da espécie e o registro fotográfico foram realizados na Embrapa Arroz e Feijão-GO com câmera digital NIKON COOLPIX L6 e as complementações de medidas, análise e descrições no laboratório de Anatomia Vegetal (UFG), por meio da observação à vista desarmada e também com o auxílio de microscópio estereoscópico, literatura especializada.

Com o objetivo de analisar a arquitetura foliar, as folhas da região basal e medianas dos caules foram submetidas ao processo de diafanização, segundo método proposto por Shobe & Lersten (1967), com as seguintes modificações: clarificação com solução de hidróxido de sódio

a 10% (24 a 48 horas), após este período, as folhas foram lavadas em água destilada com 3 trocas de 10 min. cada; em seguida foram colocadas numa solução de hipoclorito de sódio a 12% (1 hora), lavando novamente em água destilada 3 trocas, 10 min. cada; logo após foram desidratadas em série etanólica crescente (30, 50, 70, 95%, por 20 min. em cada etapa); logo a seguir passou na solução de xileno-etanol 100% 1:1 (1 hora); e coloração com safranina 1% em mistura de etanol 100% e xilol (1:1, v/v). O tempo de permanência do material botânico nas soluções foi de 48 h. As folhas foram distendidas em placas de vidro, tendo como meio de montagem resina sintética (PAIVA *et al.*, 2006). Para o estudo da rede menor de nervuras, fragmentos do terço mediano da lâmina foliar diafanizada foram montados em lâminas histológicas. Para a análise do padrão de nervação foram confeccionadas a partir das próprias placas de vidro que serviram como negativos e scaneadas. Para a descrição e classificação dos padrões de nervação utilizaram-se os tipos básicos definidos por Hickey (1979).

#### *Caracterização anatômica da espécie*

Para análise anatômica foram utilizadas quatro folhas totalmente expandidas e retirados fragmentos da região mediana do pecíolo, peciólulo, raque e da lâmina foliar do folíolo (bordo, entre - nervura e nervura central). As amostras foram fixadas em FAA<sub>70</sub> (álcool etílico 70%, ácido acético e formol) por um período de 48 horas e posteriormente armazenadas em álcool etílico 70%. A confecção das lâminas histológicas foi realizada a partir de secções transversais e paradérmicas da lâmina foliar do folíolo e secções transversais do pecíolo, peciólulo, raque, a mão livre. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 6%, lavadas em água destilada e em seguida submetidas à dupla coloração com fucsina básica 0,1% e azul de Astra 0,3% na proporção 1:3 (em média 3 min.). Posteriormente as secções foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando-se glicerina 50%.

A fim de reconhecer alguns constituintes celulares foram realizados os testes histoquímicos, em material fresco, sem qualquer tratamento, sendo que, para cada teste foram feitas três repetições. Foram utilizadas secções feitas à mão livre e submetidas a reagentes específicos conforme tabela abaixo:

**Tabela 1.** Teste histoquímico utilizados na detecção de compostos metabólicos nas secções transversais da lâmina foliar de *Azadirachta indica* A. Juss.

Grupos de Metabólitos	Em luz Visível
Amido, Celulose e Lignina	Lugol (Jonhasen, 1964).
	Cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Compostos fenólicos	Dicromato de potássio (Gabe 1968).
	Cloreto férrico III (Johansen, 1940).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Compostos lipofílicos	Sudan Black B (Jensen, 1962).
	Sudan IV (Jensen, 1962).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Proteínas	Azul brilhante de comassie (Fisher, 1968).
	Azul mercúrio de bromofenol (Mazia <i>et al.</i> , 1953).

Para o reconhecimento de amido e inclusões de natureza cristalina, o material vegetal foi também analisado sob luz polarizada.

As fotomicrografias referentes às estruturas anatômicas foram feitas em fotomicroscópio modelo ZEISS-AXIOSKOP acoplado à câmara clara com utilização de filme fotográfico ASA 100 do laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Goiás. As escalas que acompanham as ilustrações foram obtidas nas mesmas condições ópticas.

## RESULTADOS

### *Morfologia*

Árvore de 15 a 20 m de altura, com tronco semiereto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, com fissuras e escamas, de coloração marrom-avermelhada, o diâmetro da copa varia de 8 a 12m, podendo atingir 15 m em árvores isoladas. Decidual, de copa densa (Fig.1. A - D). FOLHAS compostas alternas, imparipinadas, de 10 - 38 cm de comprimento, com 3-8 pares de folíolos opostos ou quase opostos, lanceolados, de 3-7 cm de comprimento, Ápice acuminados base assimétrica e margem serrada (Fig. 2A). Nervação peninérvea craspedódroma, com nervuras até a quarta ordem, a nervura primária é de orientação reta, proeminente na face abaxial, com maior calibre na base, atenuando em direção ao ápice. As secundárias apresentam-se em geral, em dezesseis a vinte e dois pares de nervuras

originando-se de maneira simples na base, alternas rumo ao ápice; espaçadas uniformemente ao longo de toda a folha, curso inclinado (Fig. 4A- D). Pecíolo verde, cilíndrico, de 8 a 12 cm de diâmetro. PECIÓLULO verde, glabro, de 0,3 a 0,5 mm, com bases achatadas. Flores em panículas axilares mais curtas que as folhas; pequenas, pentâmeras, de cor branca ou creme, com o tubo estaminal tão largo quanto às pétalas, ovário súpero (Fig. 4A). Fruto em drupa, oblongo, de 1,2-2 cm de largura, de cor verde amarelada tornando-se púrpura, com uma semente. Floresce de fevereiro a maio e seus frutos amadurecem de junho a agosto, na área de ocorrência natural. No nordeste do Brasil, produz sementes em quantidades a partir de um ano de idade. Apresenta forte vigor de rebrota a partir das raízes.

Na região de ocorrências natural da espécie, os solos podem ser ricos em matéria-orgânica, com pH alto e pouco fósforo disponível (SOUZA; LORENZI, 2012).



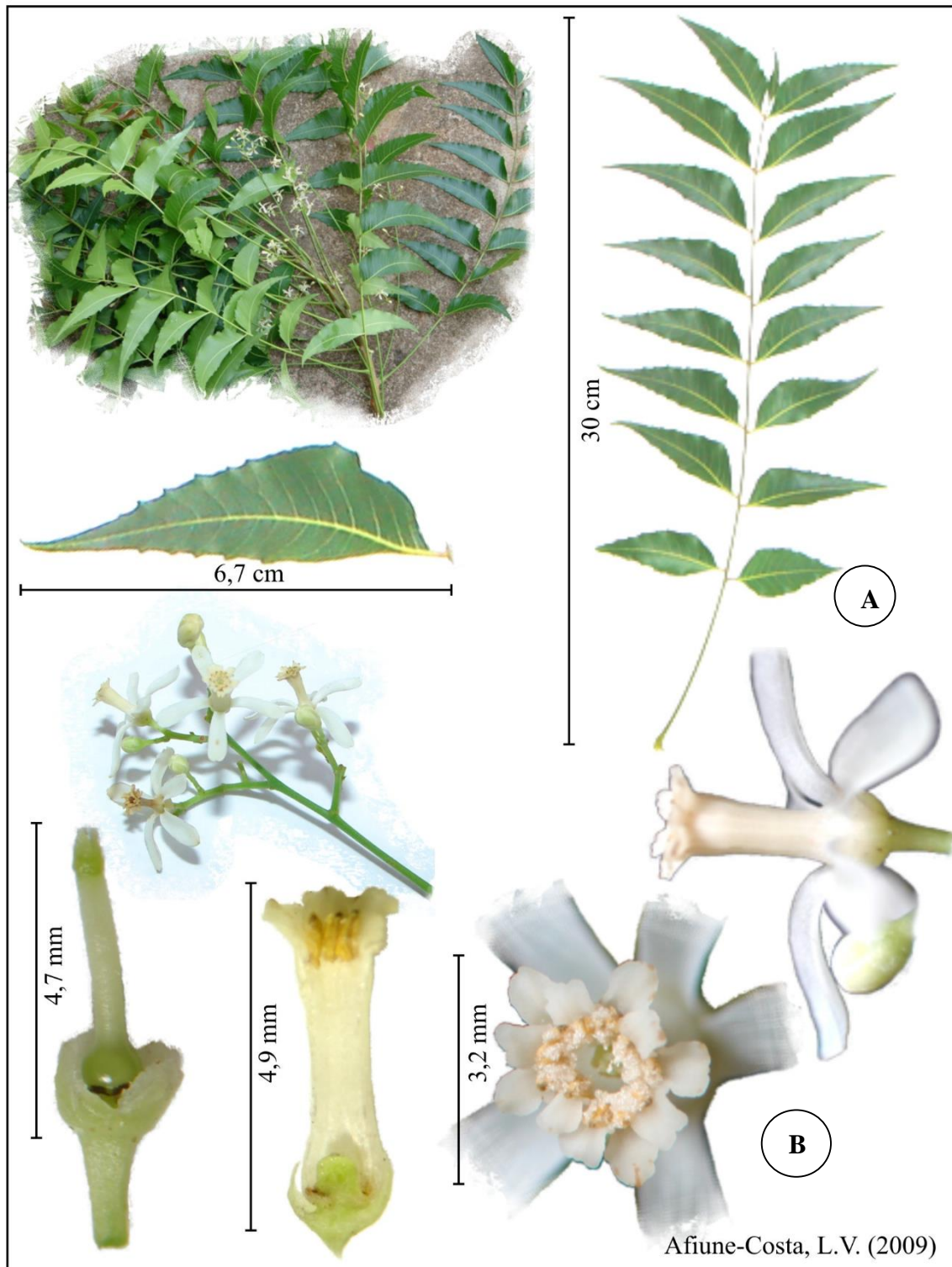
Faria, M.T. (2009)

**Figura. 1.** *Azadirachta indica*. **A-** Aspecto Geral; **B-** Detalhe das flores brancas; **C-** Detalhe da inflorescência paniculada; **D-** Detalhe do tronco com fissuras e escamas, de coloração marrom-avermelhada.

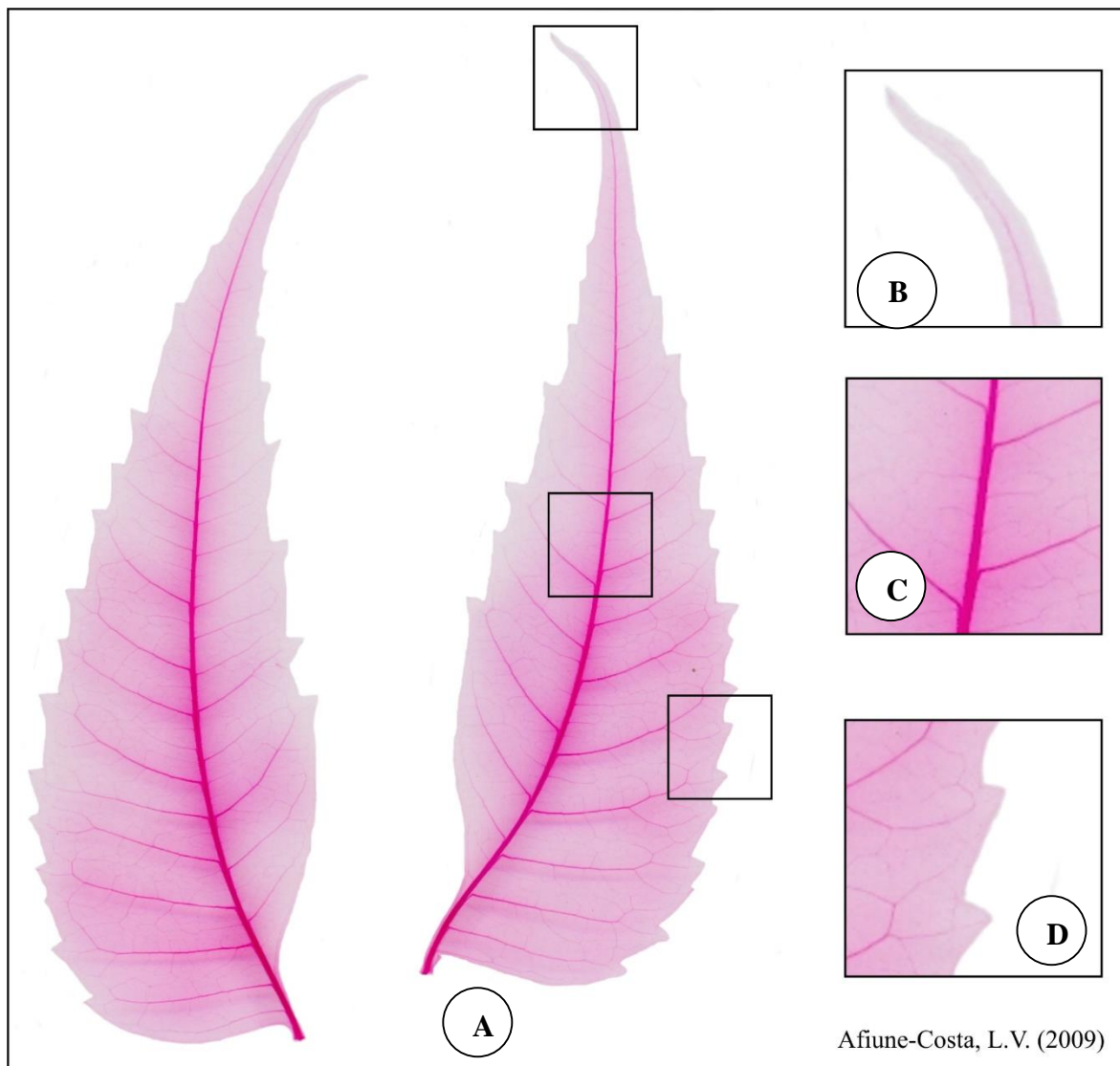


**Figura. 2.** *Azadirachta indica*. A- Aspecto geral das flores em panículas axilares mais curtas que as folhas; pequenas, pentâmeras, de cor branca ou creme, com o tubo estaminal tão largo quanto às pétalas (seta).





**Figura. 3.** *Azadirachta indica*. **A-** Detalhe das folhas compostas alternas, imparipinadas, com 3-8 pares de folíolos opostos ou quase opostos, lanceolados, de acuminados, com margem serreada e base assimétrica. **B** – Detalhe Flores em panículas axilares mais curtas que as folhas; pequenas, pentâmeras, de cor branca ou creme, com o tubo estaminal tão longo quanto às pétalas, ovário súpero.



**Figura. 4. Aspectos da morfologia e Venação foliar de *Azadirachta indica*.** **A-** Nervação penínérvea craspedódroma, com nervuras até a quarta ordem, a nervura primária é de orientação reta, proeminente na face abaxial, com maior calibre na base, atenuando em direção ao ápice; base assimétrica. **B-** Detalhe do ápice acuminado; **C** – Detalhe das nervuras secundária opostas; **D-** detalhe da Margem serreada.

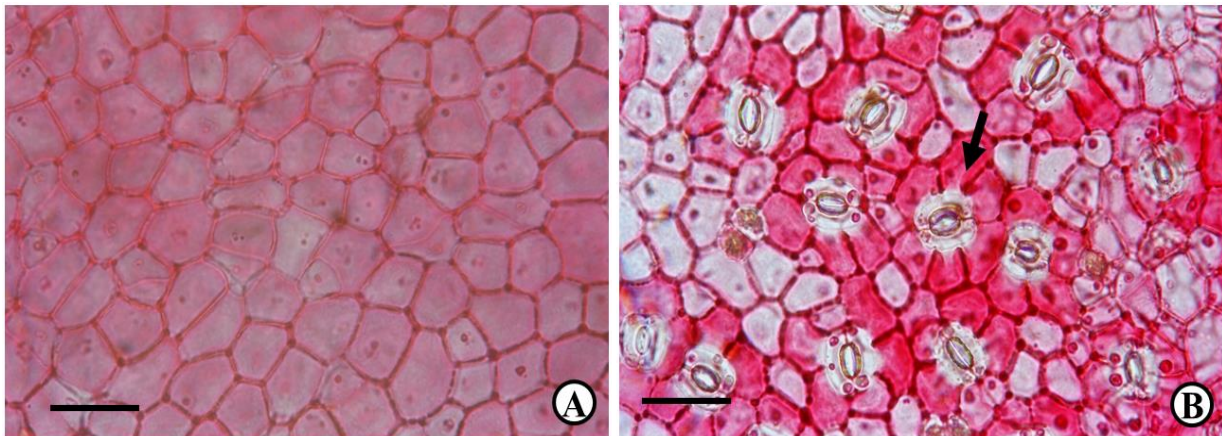
## Anatomia

### *Lâmina Foliar – Epiderme*

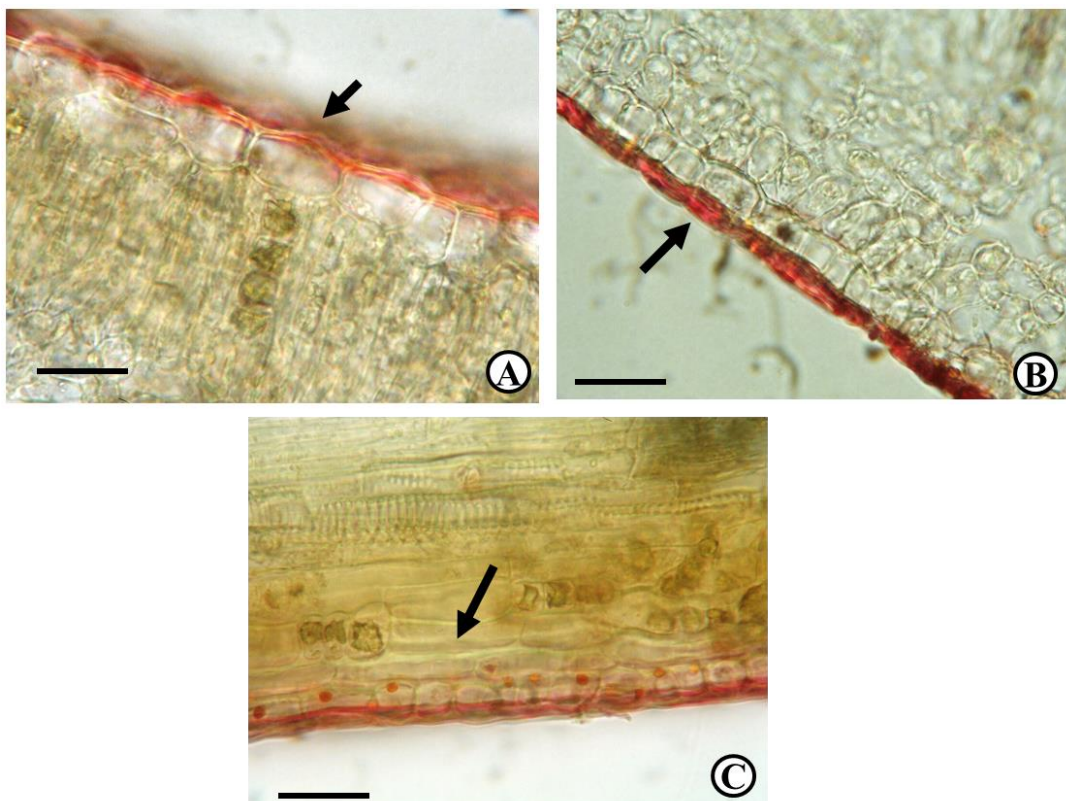
Em secção transversal a lâmina foliar de *A. indica*, apresenta epiderme adaxial uniestratificada, as células são retangulares com eixo periclinal maior que o anticlinal, as paredes periclinais externas e internas são levemente arredondadas, e as anticlinais predominantemente retas (Fig. 5A), essas células são recobertas por cutícula espessa, presença de tricoma glandular peltado localizados em sulcos na epiderme. A epiderme na superfície

abaxial, também se apresenta uniestratificada, cujas células são do mesmo tamanho que as da adaxial; a cutícula que recobre essa superfície é espessa como a face adaxial (Fig. 5B), presença gotículas lipídicas (Fig. 5C). No limbo em algumas regiões há uma subepiderme com dois a quatro estratos de células em ambas as faces da lâmina foliar (Fig. 5C).

Em vista frontal, as células epidérmicas na face adaxial possuem formas e tamanhos



variáveis, em geral são poligonais, tendo de 4-6 lados, mais frequentemente seis, suas paredes são espessas e retas (Fig. 6A).



**Fig. 5. Seções transversais da lâmina foliar de *Aspidochloa intima* com: A- epiderme adaxial evidenciando epiderme adaxial cutícula espessa (seta). B- epiderme abaxial evidenciando cutícula espessa (seta). C- uma subepiderme com dois a quatro estratos de células na face abaxial (seta). Barra = 30 µm (A, C).**

Em secção transversal, observa-se que os estômatos encontram-se nivelados em relação às demais células epidérmicas. As células - guarda possuem espessamentos nas paredes periclinais externas e anticlinais, havendo projeção em duas pequenas cristas.

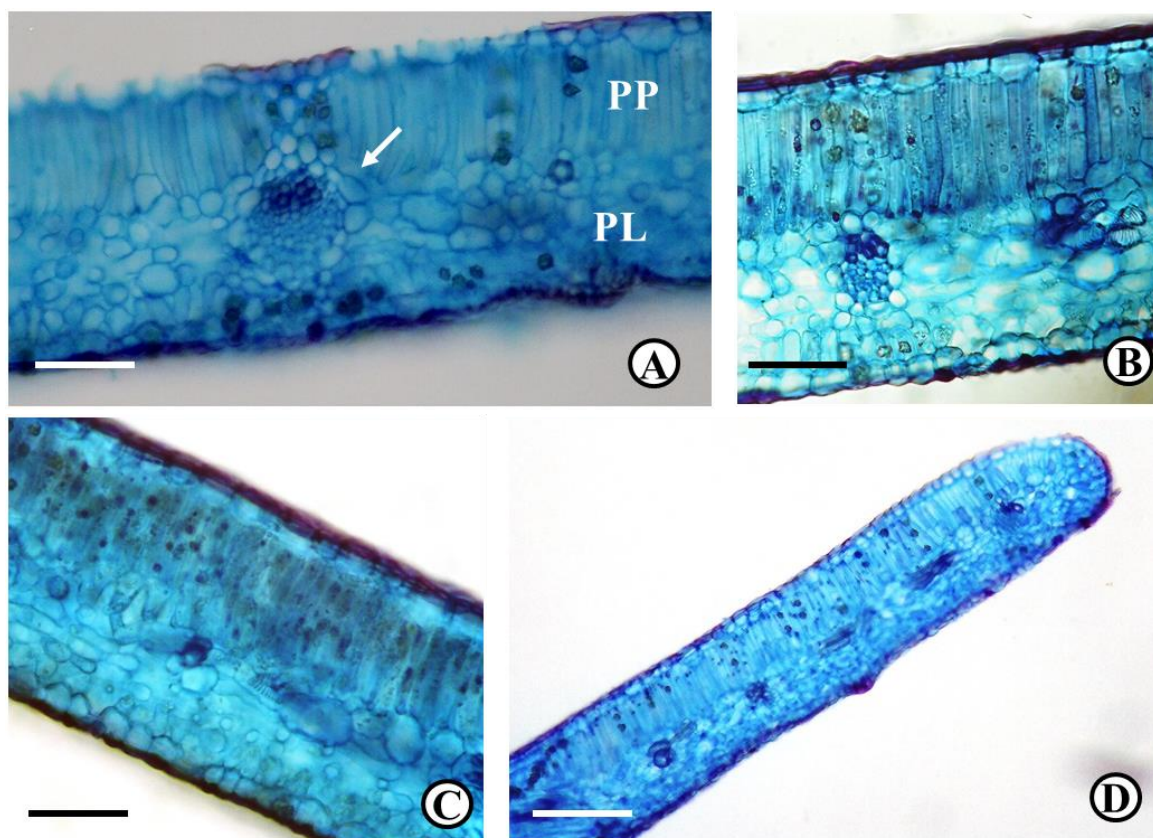
**Figura. 6. Secções paradérmicas da lâmina foliar de *Azadirachta indica*. A-** Face adaxial, epiderme evidenciando paredes anticlinais retas. **B-** Face abaxial evidenciando paredes anticlinais retas, estômatos anomocíticos (seta). Barras = 20µm (A –B).

### *Mesofilo*

O mesofilo, em secção transversal, é dorsiventral (Fig. 7A-C), o parênquima paliçádico é compacto e possui uma a duas camadas de células alongadas e compactas (Fig. 7A). O parênquima lacunoso está organizado em número de quatro a seis camadas, que apresentam tamanhos e formatos variados ao longo do mesófilo, resultando na formação de espaços intercelulares de tamanhos variados. O mesofilo é percorrido por feixes vasculares colaterais, de pequeno porte, circundados por uma bainha parenquimática, onde se estende até a superfície foliar com presença de cristais. (Fig. 7A-B). Idioblastos representados por células secretoras, comparativamente maiores, ovaladas e de conteúdo lipofílico, mucilaginoso e numerosos idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio (Fig. 7A-B.) são encontrados nesta região.

### *Bordo*

Na região do bordo, em secção transversal, entre o último feixe vascular e a epiderme ocorre parênquima clorofiliano, o bordo é arredondado nessa região as células epidérmicas apresentam cutícula mais espessa (Fig. 7D).

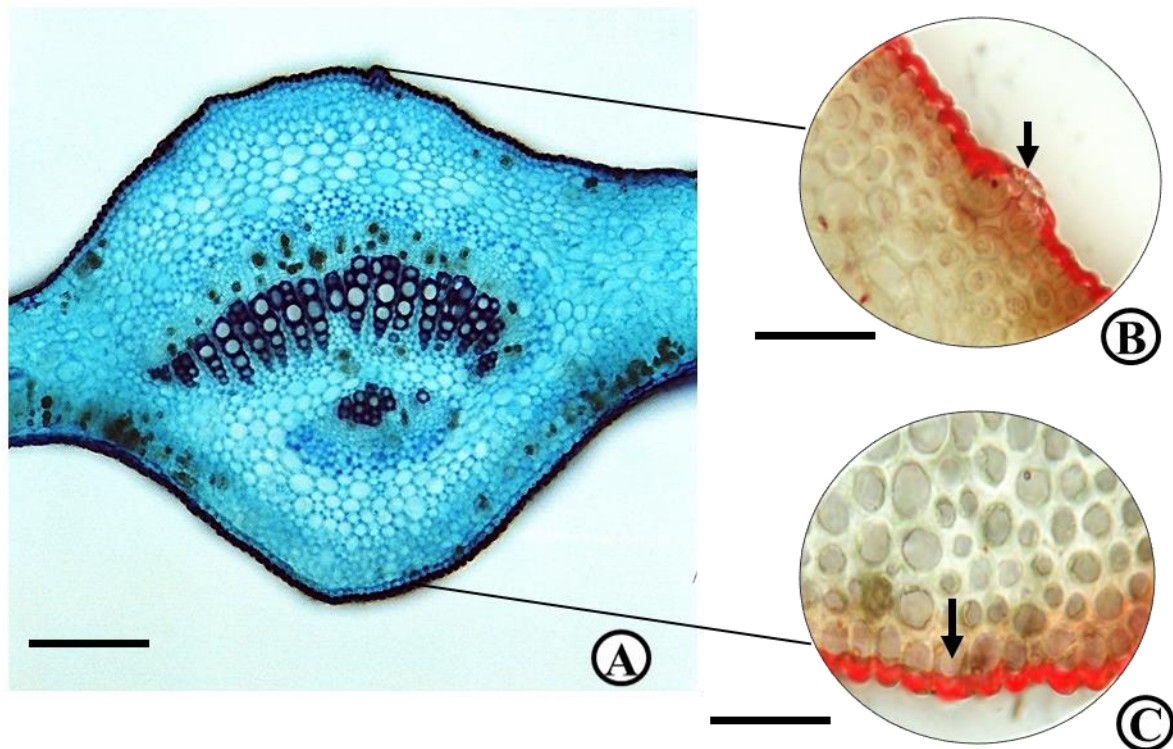


**Figura. 7. Secções transversais da lâmina foliar de *Azadirachta*.** A- Aspecto geral do mesofilo dorsiventral. B - Nervuras de médio porte, envolvidas por bainha parenquimática (seta), presença de cristais de oxalato de cálcio; C- Detalhe do mesofilo dorsiventral; D- Aspecto geral do bordo arredondado. Barra = 50 $\mu$ m (A e B). Legenda: PL= Parênquima Lacunoso; PP= parênquima paliçádico.

### *Nervura principal*

Em secção transversal, a nervura principal apresenta formato biconvexo, com maior proeminência na abaxial (Fig. 8A). Tanto a epiderme adaxial quanto abaxial apresentam-se uniestratificada, com células retangulares, recobertas por cutícula espessa (Fig. 8B-C), nota-se a presença de tricomas glandulares peltados com maior frequência na face adaxial. Presença de raros estômatos na face adaxial (Fig. 8B). Na sequência, notam-se cerca de oito estratos de colênquima anelar junto à face adaxial e de quatro camadas no lado oposto. Amiloplastos e drusas de oxalato de cálcio estão presentes no parênquima fundamental e no floema (Fig. 8A). O parênquima clorofiliano do mesofilo se estende levemente em direção a face abaxial da nervura principal. O feixe vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto. O feixe está

envolvido por uma faixa estreita de fibras esclerenquimáticas com 3-6 camadas de células, são observados pequenos feixes que se desprendem do principal rumo à face adaxial.



**Figura 8. Secções transversais da nervura central de *Azadirachta indica*.** A- Aspecto geral da nervura central apresentando convexidade para ambas as faces sendo que na superfície adaxial é, mas proeminente. B - detalhe da epiderme adaxial, evidenciando cutícula espessa e presença de raros estômatos (seta). C- Detalhe da epiderme abaxial, evidenciando cutícula espessa (seta). Barra= 130 $\mu$ m (A); 20 $\mu$ m (B e C).

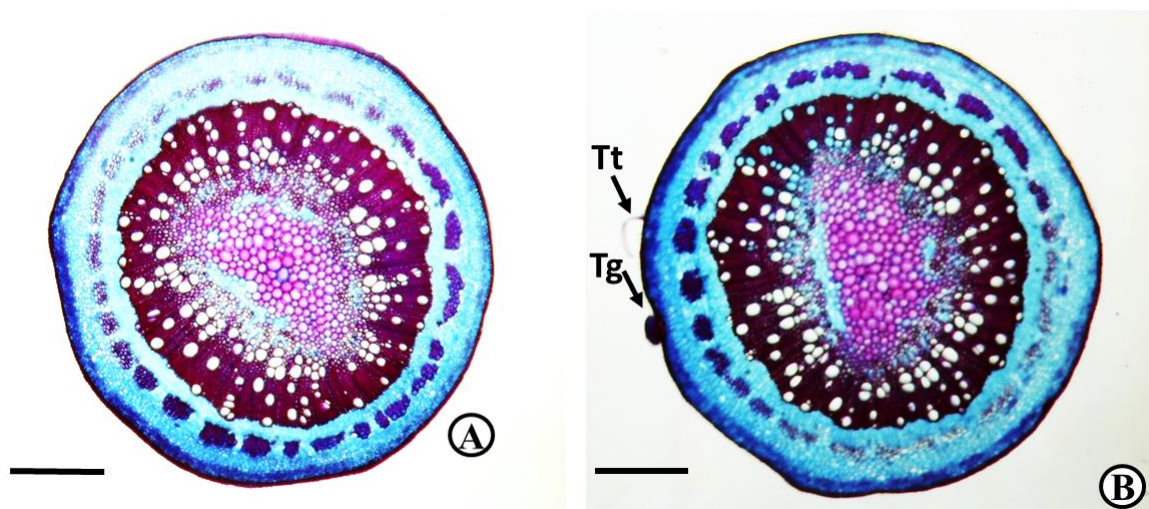
### *Raque*

Em secção transversal a raque de *A. indica* possui contorno cilíndrico, a epiderme é uniestratificada, constituída por células de tamanhos variáveis, as paredes periclinais externas exibem contorno convexo e são revestidas por cutícula espessa. A região cortical é constituída por colênquima angular subepidérmico, com três a seis camadas de células. Os estratos de células parenquimáticas situadas abaixo da faixa colenquimática e delimitando o cilindro vascular contêm amido e cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Nos cordões colenquimáticos corticais, as células mais internas sofrem esclerificação, diferenciando-se em fibras. O cilindro central é constituído por um anel de feixes vasculares colaterais que envolvem uma medula parenquimática. O crescimento secundário se restringe à formação de tecidos vasculares

secundários, não ocorrendo o desenvolvimento de periderme. Os raios parenquimáticos são largos e apresentam-se constituídos por cerca seis a oito fileiras de células (Fig. 9A).

#### *Pecíolo*

Em secção transversal o pecíolo de *A. indica* possui as mesmas características anatômicas da raque, diferenciando apenas pela presença de tricomas tectores e glandulares peltados (Fig. 9B).

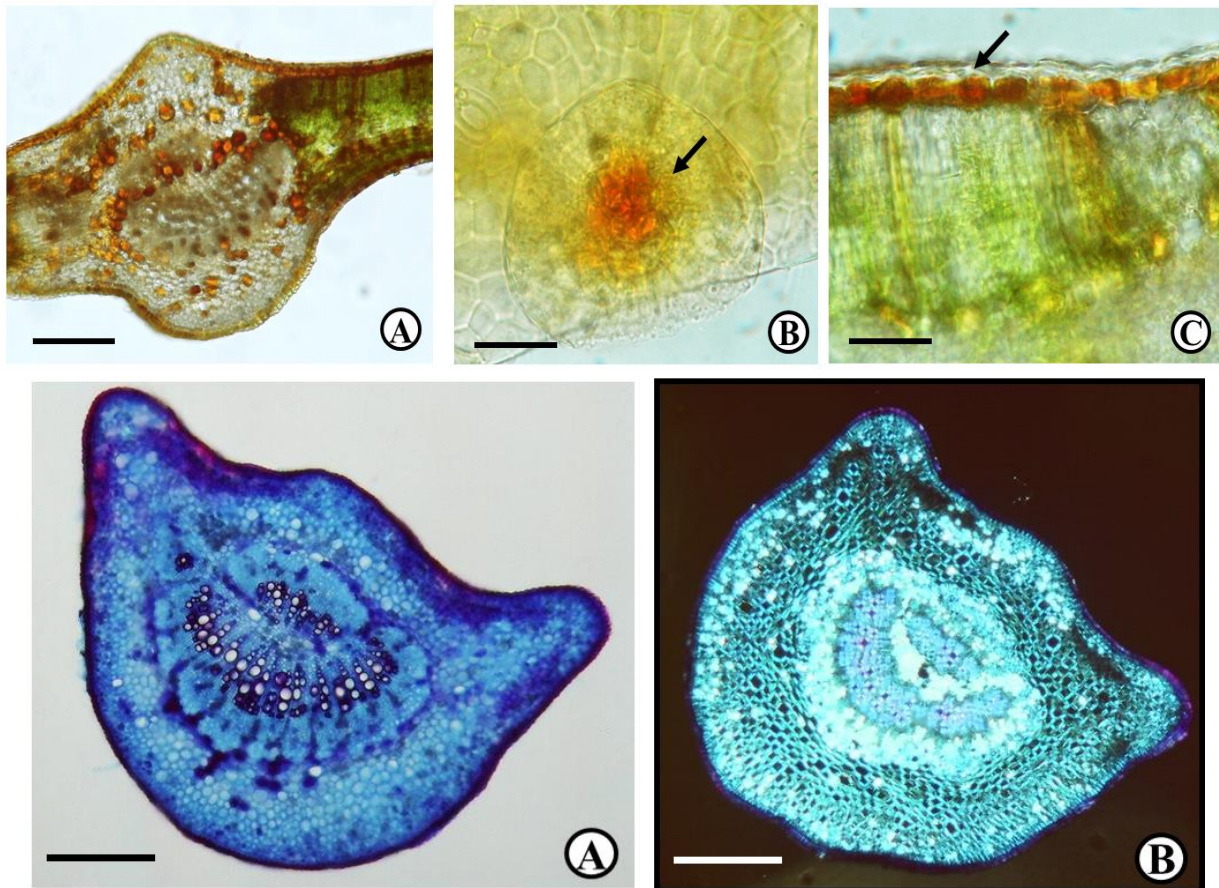


**Figura. 9.** Secções transversais da mediana da Raque e Pecíolo *Azadirachta indica*. **A**- Raque, evidenciando apresentado início de crescimento secundário; **B** – Pecíolo, evidenciando apresentado início de crescimento secundário, presença de tricoma glandular (Tg), e tricoma tector (Tt). Barra = 20 $\mu$ m (A, B).

#### *Peciólulo*

O peciólulo possui duas pequenas expansões laminares na face adaxial. A epiderme uniestratificada é constituída por células de tamanhos reduzidos, as paredes periclinais externas exibem contorno convexo e encontram-se revestidas por cutícula espessa. Externamente, o córtex é formado por colênquima angular e parênquima constituído de células com paredes espessas. Em algumas regiões do córtex foram observadas células parenquimáticas com paredes delgadas. Presença de grande quantidade de idioblastos contendo drusas e cristais de oxalato de cálcio. O feixe vascular é do tipo colateral, organizado em arco fechado, interrompido em

algumas regiões por células parenquimáticas. O feixe está envolvido por uma faixa estreita de fibras esclerenquimáticas com 3- 8 camadas de células (Fig. 10 A-B).



**Figura 10. Seções transversais do Pecíolulo de *Azadirachta indica*. A-** Aspecto geral do pecíolulo. **B-** Aspecto geral do pecíolulo em luz polarizada, evidenciando cristais de oxalato de cálcio e drusas. Barra= 100 $\mu$ m (A, B).

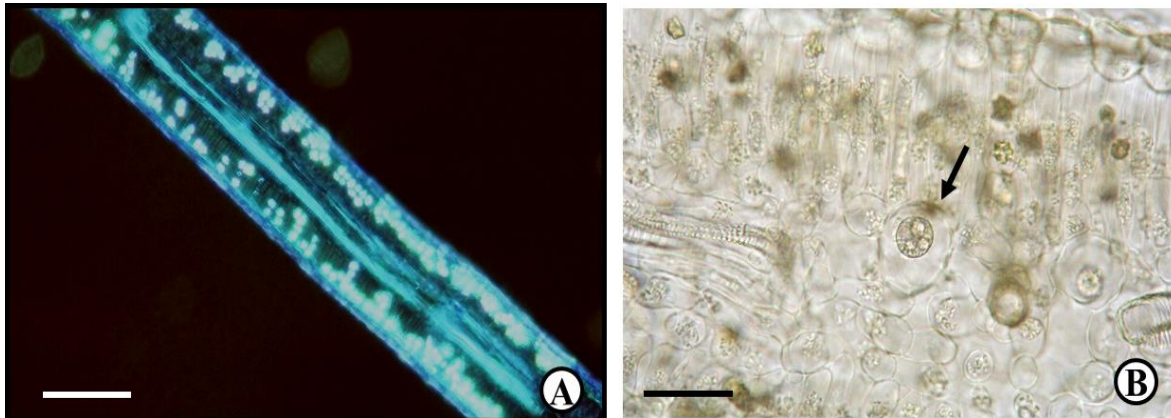
### HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR

Foram detectados compostos lipofílicos: cutina, lipídios no tecido parenquimático, principalmente no mesofilo, tricoma glandular peltado e na epiderme, gotículas lipídicas, confirmado pela reação positiva com sudan IV e Steinmetz (Fig. 11A- C).

**Figura. 11. Testes Histoquímicos da lâmina foliar *Azadirachta indica* A. Juss (Neem).** **A-** Detalhe do mesofilo evidenciando lipídios (Lp), epiderme com cutícula espessa (seta), reagente sudan IV. **B-** Tricoma glandular peltado, presença de lipídios. **C-** Nervura central, evidenciando gotas lipídicas no parênquima. Barra = 20 $\mu$ m (A- C).



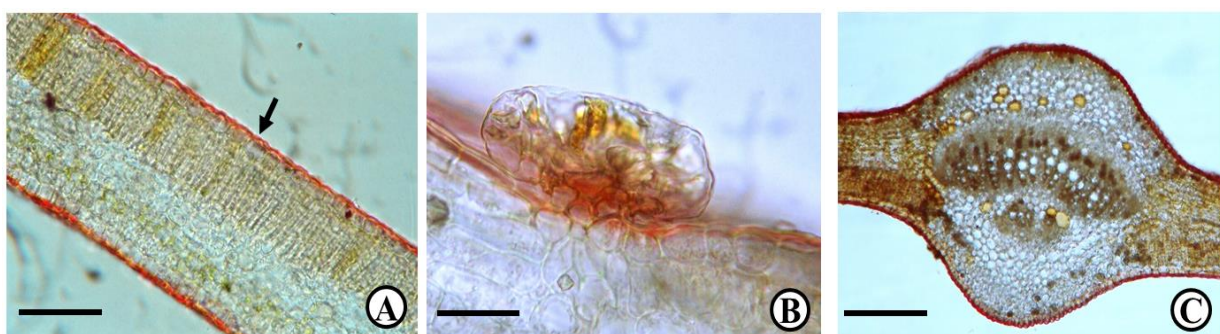
Grãos de amido foram evidenciados principalmente, no parênquima clorofiliano próximo à face abaxial e em células isoladas na região medular da nervura principal, sendo confirmados com análise em luz polarizada e Lugol.



Os compostos fenólicos foram observados, principalmente na epiderme, no mesofilo, nos tecidos parenquimáticos da nervura principal, nos tricomas glandulares, sendo confirmado com reação positiva com dicromato de potássio e cloreto férrico a 10% (Fig. 12 A-C).

**Figura. 12. Testes Histoquímicos da lâmina foliar de *Azadirachta indica*.** A- Aspecto geral da nervura central, evidenciando gotas Compostos fenólicos (CF), reagente cloreto férrico III. B- tricoma glandular em vista frontal, evidenciando compostos fenólicos nas células basais do tricoma glandular (Seta). C- Detalhe do mesofilo, evidenciando epiderme com compostos fenólicos, reagente dicromato de potássio (seta). Barra = 100 $\mu$ m (A- C).

A presença de cristais de oxalato de cálcio na epiderme adaxial, entre as nervuras de menor porte, no parênquima cortical e medular da nervura principal, confirmado pela reação positiva em ácido sulfúrico e análise em luz polarizada (Fig. 13A).



**Figura. 13. Testes Histoquímicos da lâmina foliar *Azadirachta indica*** A- Aspecto geral do mesofilo em luz polarizada, evidenciando Cristais de oxalato de cálcio e drusas. B- Detalhe do mesofilo, evidenciando idioblasto com mucilagem (Seta). Barra = 20 $\mu$ m (A, B).

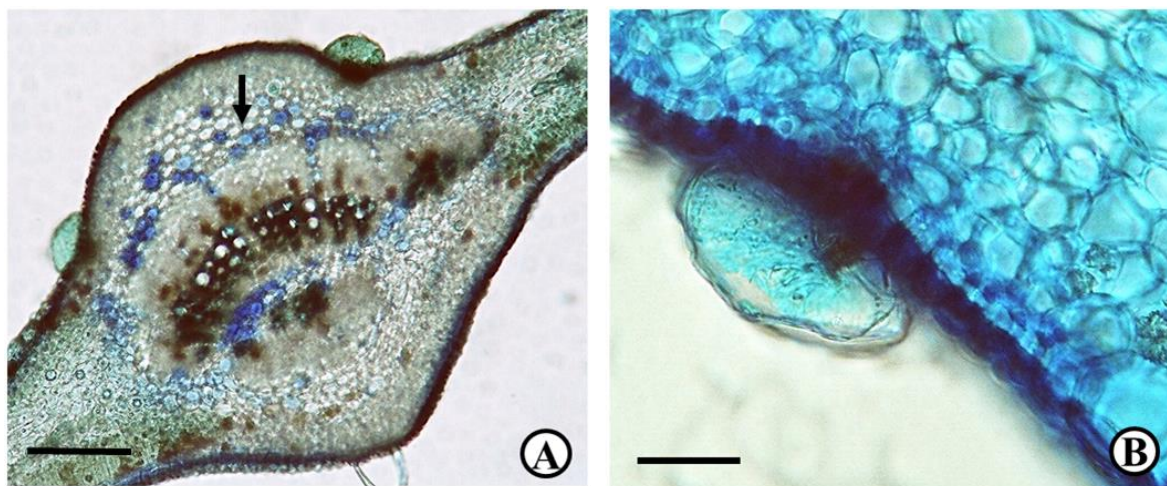
Foi observada mucilagem em células da epiderme, no córtex e medula da nervura central e algumas regiões do mesofilo, sendo confirmado com teste com azul de metileno (Fig. 14 A-B).

**Figura 14. Testes Histoquímicos da lâmina foliar *Azadirachta indica*.** A- aspecto geral da nervura central, evidenciando mucilagem no parênquima, reagente azul de metileno (seta). B- Detalhe da epiderme abaxial da nervura central, evidenciando mucilagem nas células epidérmicas (seta). Barra = 30µm (A, B).

### DISCUSSÃO

A espécie *A. indica* de acordo com a padronização sugerida por Hickey (1979) apresenta padrão de venação do tipo broquidódroma, o que foi observado por (AMARAL 1981 e MOSCHETA, 1995), observa ainda nervuras de até quatro ordens, com venações mais finas formam um retículo relativamente uniforme que não permite diferenciação de calibre entre as mesmas, o que pode ser utilizado, quando associado a outros caracteres, no reconhecimento da mesma quanto em estágio vegetativo.

Quanto à anatomia foliar, *A. indicam* possui características semelhantes às observadas (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1983; MOURÃO *et al.*, 2002 e LAGOS;DUARTE, 2007) para as Meliaceae: cujo padrão compreende folhas hipoestomaticas, presença de estômatos anomocíticos exclusivamente na face abaxial da epiderme, mesofilo dorsiventral, tricomas tectores e tricomas glandulares peltados em depressões, cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa geralmente nos tecidos parenquimáticos, podendo ocorrer na



epiderme adaxial e abaxial e no floema na nervura central.

*A. indica* apresenta cutícula espessa em toda a epiderme da lâmina foliar e nervura central. Esaú (1977) afirma que a cutícula espessa desempenha relevante papel na redução da perda de água. Vários estudos com folhas de diferentes espécies vegetais relatam que epidermes com paredes espessas são encontradas, geralmente, em folhas sob luz solar intensa, podendo

ser uma estratégia para aumentar a reflexão dos raios luminosos (CHAZDON; KAUFMANN, 1993).

As características dos estômatos podem ser vistas sob diferentes perspectivas, e serem utilizadas em estudos de ecologia, evolução, fisiologia, morfologia e taxonomia. A função dessas estruturas especializadas e, provavelmente a sua distribuição, tem papel importante na evolução e conquista terrestre das plantas (CROXDALE, 2000).

A espécie é hipoestomatica ocorrendo estômatos predominantemente anomocíticos. Corroborando os dados de Solereder (1908), Metcalfe & Chalk (1983), são registradas também por Olowokudejo & Nyananyo (1990) e Moscheta (1995), mas em seu trabalho Sanogo *et al.* (2001) mencionam para *Trichilia roka* (Forssk.). Chiov, sinônimo de *T. emetica*, a ocorrência de estômatos em ambas as superfícies foliares. Essa constatação indica que folha hipoestomática deve ser considerada como freqüente e não, invariável para Meliaceae.

Foram observados estômatos na epiderme da região da nervura central, podendo constituir um caráter relevante para a taxonomia do grupo. Metcalfe & Chalk (1988), ressalta que normalmente os estômatos não ocorrem na epiderme da nervura principal e quando isto acontece, não são funcionais.

Foi observado à presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas ou monocristais prismáticos, na epiderme mesofilo e no floema na região da nervura central, são considerados produtos de excreção da planta (ESAÚ, 1977) e segundo Franceschi & Horner (1980) vários autores relacionam os cristais de oxalato de cálcio com a proteção contra animais herbívoros e possível função de suporte mecânico. A ocorrência de cristais de oxalato de cálcio é relatada na família Solereder (1908), Metcalfe & Chalk (1988).

Podem ser destacados também, alguns aspectos anatômicos do mesofilo que fornecem dados importantes para a taxonomia do grupo como a dorsiventral idade do mesofilo com células do parênquima paliçádico longo- colunares e compactas e lacunoso com espaços intercelulares e formas de células diferenciadas, presença de tecido subepiderme (Hipoderme). Solereder (1908), Metcalfe & Chalk (1988), afirmam que este tipo de tecido pode ocorrer em alguns gêneros de meliácea, mas como não foi feito estudos ontogênicos não podemos afirmar que este tecido seja mesmo uma hipoderme. Os feixes vasculares de menor calibre nesta região são colaterais e todos apresentam uma endoderme, com extensão de bainha parenquimática que se prolonga até uma ou as duas superfícies foliares.

Na nervura central o feixe vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto. Ao se referirem à organização do sistema vascular da nervura principal da família Metcalfe &

Chalk (1988), citam que este tipo sistema vascular foi encontrado em alguns espécies de Meliaceae.

Tricomas de tipos variados podem ocorrer em Meliaceae (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1988), tendo sido constatados tricomas tectores simples, tricomas glandulares peltados. De um modo geral, os tricomas desempenham papel diagnóstico relevante, uma vez que o número de espécies destituídas dessas formações epidérmicas é reduzido em Magnoliophyta e as condições ambientais influenciam mais o tamanho e a densidade dos tricomas do que o tipo destes (METCALFE; CHALK, 1988).

Os estudos histoquímicos demonstraram a presença de metabólitos primários como grãos de amido, compostos lipofílicos. De acordo com Fahn (1988), dentre os materiais lipofílicos secretados pelas plantas estão os terpenos, lipídios.

Entre os metabólitos secundários constatou-se a presença de lignina, cristais e os compostos fenólicos.

Segundo Pyykkö (1966) a ocorrência de cristais nas folhas é um caráter exclusivo em nível de família ou gênero, não havendo relação com o ambiente.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas estão relacionados, principalmente, com a proteção, exercendo efeito sobre microorganismos que as infectam, de interesse farmacológico, tem sido apontada a atividade antibacteriana e antiviral (KIMURA *et al.*, 1987).

## CONCLUSÃO

Os dados estruturais apresentados neste estudo de *A. indicam* são compatíveis com os relatados para as Meliaceae e contribuem para o conhecimento dessa espécie, pouco investigada sob o ponto de vista morfológico- anatômico e histoquímico.

Alguns caracteres da anatomia foliar são potencialmente promissores para a taxonomia do grupo quando usados isolados ou em combinação, tais como: o tipo de estômato, a conformação do sistema vascular da nervura principal, tricomas glandulares peltados drusas de oxalato de cálcio no mesofilo, na epiderme e no floema, nervura principal com feixe colateral em forma de arco aberto no folíolo, além raque, pecíolo com início de crescimento secundário, presença de uma camada a subepidérmica. O presente trabalho é apenas o início de um processo de análises sobre *A. indicam* são necessários vários estudos adicionais levando-se em conta aspectos estruturais e fisiológicos, para melhorar o processo de identificação da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAMEH, A. *et al.* Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, Dordrecht, v.154, p.79-84. 2002.
- BANDYOYOPADHYAY, U, KAUSHIK. B., SENGUPTA. A, MOITRA, P., DUTTA,P., SARKAR, D., DEBNATH, P.; GANGULUY, C.K., RANAJIT, B.K. Chemical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extraction gastric secretion and gastroduodenal ulcer. *Life Sciences*, vol. 75, p. 2867-2878. 2004.
- BANERJI, B. e NIGAM, S.K. Wood constituents of Meliaceae: a review. *Fitoterapia*, vol. 55 (1), p. 3-36. 1984.
- BARROSO, G. M., MORIN, M. P., PEIXOTO, A. L. E ICHASO, C. L. F. Frutos e Sementes: Morfologia aplicada à sistemática de Dicotiledôneas, UFV, Imprensa Universitária, Viçosa, P. 443. 1999.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., ICHASO, C. L. F., COSTA, C. G., GUIMARÃES, E. F. E LIMA, H. C. Sistemática das Angiospermas do Brasil, UFV, Imprensa Universitária, Viçosa, vol.2, pp. 283-303. 1984
- BEZERRA, P.; FERNANDES, A. **Fundamentos de Taxonomia vegetal**. Fortaleza: Fungi Ed. New York: Harper & Row, p. 819. 1980.
- BHATTACHARYA, D., P. M. SARMA, S. KRISHNAN, S. MISHRA, AND B. LAL. Evaluation of the genetic diversity among some strains of *Pseudomonas citronellolis* isolated from oily sludge-contaminated sites . *Appl . Environ . Microbiol .* vol. 69, p. 1435-1441. 2003.
- BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Journal of the Chemical Society, London*, vol.35, n.1, p.23-24.1968.
- CHATTOPADHYAY, R.R., Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.* Vol. 28, 3, p. 449 – 451. 1997.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, Oxford, vol. 7, p. 385-394. 1993.
- CHOPRA, R.N. The nim (*Melia azadirachta* L. Meliaceae). In: CHOPRA, R.N. *Indigenous drugs of India*. 2. ed. Nova Delhi: Academic Publishers, p 360-363. 1958.
- COCCA, C. 2011. O que é Neem? Alternativas naturais para o controle de ectoparasitas. <http://www.veterinariosnodiva.com.br/carmen-cocca.htm#bichos>. Acesso 01/12/2014.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3v. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

- CROXDALE, J. L. Stomatal patterning in angiosperms. **American Journal of Botany**, vol 87(8), p.1069-1080. 2000.
- D'AMBROSIO, M.; GUERRIERO, A. Degraded limonoids from *Melia azedarach* and biogenetic implications. *Phytochemistry*. vol. 60, 419–424. 2002.
- DASGUPTA, T., BANERJEE, T., YADAVA, P.K., RAO, A. R. Chemoprotective potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 92, p. 23 – 36. 2004.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. São Paulo: Edgard Blücher, p. 293. 1977.
- FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol*, vol. 108, p. 229-57. 1988.
- FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RSPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA, p. 220.1995.
- FISHER, D.B. Protein Staining of Rib boned peon sections for light microscopy. *Histochemie*. vol. 16, p. 92-96. 1968.
- FRANCESCHI VR and HORNER HT. Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review* 46: 361–427. 1980.
- GABE, M. **Techniques Histologiques**. Masson & Cie, Paris. 1968.
- HARIKRISHMAN, R., RANI, M.N., BALASUNDARAM, C. hematological and biochemical parameters in common carp. *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophyla* infection. *Aquaculture*, vol . 221, p. 41-50. 2003.
- HICKEY, L. J. A revised classification of the architecture of dicotyledons leaves. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. *Anatomy of dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press, vol. 1, p. 25-39. 1979.
- ISMAN, M.B., KOUL,O., LUCZYSKI, A. KAMINSKI, J. Inseticial and antecedent bioactivities of neem oils and their relationship to azadiractina content. *J. Agric. Food. Chem.* vol. 38,p. 1406 – 1411. 1990.
- JENSEN, W. A. *Botanical Phytochemistry, Principles and Practice*. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 1962.
- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York, London: Mcgraw-Hill Book Company. 1940.
- JOLY, B. A. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo. Editora Nacional, p. 777. 2000.

- KIMURA, Y., OKUDA, H., OKUDA, T., HATANOT, T., AGATA, I., ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds. V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Medica Stuttgart*, vol. 50, n.6, p.473-477. 1984.
- KOCH, C.K. El arbol de la Índia (*Azadirachta indica*) y su utilización potencial en el Ecuador con especial referencia a las propiedades plaguicidas de jus extratos. Equador: Convênio GTZ/MAG. 15p. 1990.
- KOUL, O.; ISMAN, M.B.; KETKAR, C. M. Properties and 10 Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.10, n.3, p.6-10, 2008. use of neem, *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botany*, v.68, p.1-11. 1990.
- KUMAR, S.; SURESH, P.K., VIJAYABABU, M. R.; ARUNKUMAR, A.; ARUNAKARAN, J. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC- 3). *Journal of Enthonopharmacology*, vol. 105, p. 246- 250. 2006.
- LAGOS J.B., MIGUEL O.G. & DUARTE M.R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). *Lat. Am. J. Pharm.vol . 26* (2), p. 185-90. 2007.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa, p. 231-234. 1992.
- MARTINEZ, S.S. Composição do nim. In: \_\_\_\_\_. **O Nim** - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, p. 23- 30. 2002.
- MAZIA, D., BREWER, P. A & ALFERT, M. The cytochemistry staining and measument of protein with mercuric bromophenol blue. **Biol. Bull.** n. 104; p. 57-67. 1953.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. 11, Oxford: claredon Press. 1983.
- METCALFE, C.R. & L. CHALK, L. “Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of leaf and stem”, 2<sup>nd</sup> ed., Clarendon, Oxford, vol. 1, pg. 40-53. 1988.
- MOSCHETA, I. S. Morfologia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Guarea kunthiana* A. Juss. e *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae-Melioideae). 1995. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER C. The Neem tree (*Azadirachta indica*): wide-ranging uses. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, vol.24, n.1. P. 139-148. 2005.
- MOURÃO, K.S.M.; DIAS-PINTO D.; SOUZA, L. A. MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Acta Scientiarum* , Maringá, vol. 24, n. 2, p. 601-610.2002.

NAKATANI, M.; ZHOU, J; NAKAYAMA, N.; NAKATANI, M.; ABDELGALEIL, S.A.M.; SAAD, M.M.G.; HUANG, R.C.; DOE M.; IWAGAWA, T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry*, v.65, p. 2833-2841, 2004.

NEVES, B. P. *et al.* Cultivo e utilização do Nim Indiano. Circular Técnica n. 62. Santo Antônio-GO: EMBRAPA, p. 12. 2003

OLWOKUDEJO, J. D.; NYANANYO, B. L. Taxonomy of medicinal plants. I. Epidermical morphology of the genus *Khaya* (Meliaceae) in West Africa. *Fedd. Repert.*, Berlin, vol. 101, n.7/8, p. 401-407. 1990.

PAIVA, J. G. A; Fank-De- Carvalho, S. M.; Magalhães, M. P. & Graciano- Ribeiro, D. Verniz vitral 500\*: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Bot. Bras.**, vol. 20, p. 257- 264. 2006.

PYYKKÖ, M. The leaf anatomy of east Patagonian xeromorphic plants. **Ann. Bot. Fenn.**, vol. 3(4), p. 453-622. 1966.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. *et al.* Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia*, Dordrecht, v.159, p.565-570. 2005.

RIAR S.S. *et al.* Volatile fraction of neem oil as a spermicide. *Contraception* 42:479. 1990.

SANOGO, S. ;YANG, X.B. ; LUNDEEN, P. Field response of glyphosate-tolerant soybean to herbicides and sudden death syndrome. *PLANT DISEASE*. vol.85 (7), p. 773-779. 2001.

SAXENA, R.C. Scope of neem for developing countries. Paper presented at World Nim Conference Souvenir - Bangalore, Nairobi, p. 24-28. 1993

SCHMUTTERER, H. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree. *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*. Palo Alto, vol.35. p. 271- 297. 1990.

SILVA, L. M; ALQUINI, Y; CAVALLET, V.J: Inter- relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta bot. Bras.**; vol. 19, n. 1, p. 183-194. 2005.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. PETROVICK. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. 2007.

SINHA, K. C. *et al.* Neem oil as a vaginal contraceptive. *Indian Jour. Med. Res.* vol. 79, p.131. 1984.

SOLEREDEHR, H., **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, v.1.1908.



VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova* 26: 390-400. 2003.

WINKALER, E. U. *et al.* acute lethal and sublethal effects of neem leaf extracts on the Neotropical freshwater fish of *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiology*. 2007.

Recebido em 19 de fevereiro de 2015.

Aprovado em 06 de março de 2015.