
Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*)

Chemical and antibacterial study of *Tetradenia riparia* leaves.

MARTINS, Maria Bernadete Gonçalves¹

MARTINS, Raphael Gonçalves Martins²

CAVALHEIRO, José Alberto³

^{1,3} Universidade Estadual Paulista

² Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

¹ Campus Experimental do Litoral Paulista

² Campus de Piracicaba

³ Instituto de Química – Araraquara, SP

Autor para correspondência: bernadete@csv.unesp.br

Recebido em 19 de novembro de 2008; aceito em 27 de janeiro de 2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo da histologia foliar de Tetradenia riparia, analisando folhas adultas colhidas no estágio vegetativo, por meio de estudos de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de varredura. Paralelamente, foram efetuadas análises de constituintes químicos por cromatografia de camada delgada e por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e análises da atividade antibacteriana do extrato foliar, para determinar um possível potencial terapêutico dessa planta. Os resultados obtidos permitiram classificar a folha como dorsiventral, anfiestomática, sendo comum a ocorrência de grandes câmaras subestomáticas na face abaxial. A epiderme é unisseriada, com células irregulares, as células da face adaxial são maiores que as da face abaxial, envolvidas por cutícula e portadora de tricomas glandulares e não glandulares. Há tricomas glandulares capitados e peltados, além de longos tricomas tectores, e ocorrência de diversos tricomas capitados de diferentes morfologias. Há muitas drusas no parênquima clorofiliano. O sistema vascular é do tipo colateral não contínuo, separado por células de parênquima. Por meio do espectro obtido em CLAE-DAD, constatou-se a possibilidade da presença da classe de β -pirona. Os espectros no UV obtidos para os picos 3,5,6,7,8,9 e 10 poderiam ser atribuídos, preliminarmente, a substâncias flavonoídicas ou a ésteres (ácido cafeico). O extrato aquoso foliar mostrou efeito antibacteriano para Escherichia coli e Staphylococcus aureus em todas as concentrações usadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Tetradenia riparia, anatomia foliar, cromatografia, atividade antibacteriana, tricomas secretores.*

ABSTRACT

The aim of this work was to carry through a leaf anatomical study of Tetradenia riparia, through Optic Microscopy (O. M.) and of Scanning Electron Microscopy (S.E.M.), and also to carry through a preliminary analysis. Parallel chemical constituent analyses for chromatography of thin layer and high-pressure liquid chromatography (HPLC) and analyses of the antibacterial activity of the leaf extract was made to determine a possible therapeutical potential of this plant. Transversal sections in the region of mesophyll, classify the leaf as having palisade parenchyma on upper surface, with stomata along both surfaces of the leaf, being common the occurrence of great stomata chambers in the abaxial face. There are uniseriate epidermal cells, with irregular cells, being the cells of the upper face bigger than the lower face the cells of both are involved for cuticule and having glands trichomes and no gland trichomes. There are glandulars capitades and peltades trichomes, besides long tricomas tectors, occurring several trichomes capitades of different morphologies. There are many druses in chlorophyllian parenchyma. The vascular bundle is not continuous, collateral type, separated for cells of parenchyma. Through the specter gotten in CLAE-DAD, it was evidenced possibility of the presence of the α -pirona. The specters in the UV gotten for peaks 3,5,6,7,8,9 and 10 could be attributed, preliminarily, flavonoids substances or esters (cafeic acid). The leaf extract showed to antibacterial effect for Escherichia coli and Staphylococcus aureus in all the used concentrations.

KEY WORDS: *Tetradenia riparia, leaf anatomy, chromatography, antibacterial activity, trichome secretary.*

I. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é riquíssima em exemplares com potencial terapêutico. Atualmente, existem inúmeras pesquisas em busca de moléculas ativas nas plantas, em organismos marinhos, insetos e microorganismos. A diversidade molecular é um fator importante para a procura de novas moléculas nas plantas, apresentando diferentes propriedades físico-químicas, o que representa um desafio ao químico, em isolar e determinar a estrutura desses compostos ativos, uma vez que o extrato bruto da planta pode conter centenas ou milhares de compostos (HAMBURGUER; HOSTTMANN, 1991).

Os vegetais, além da produção de celulose, lignina, proteínas e outras substâncias oriundas do metabolismo celular, são responsáveis também pela síntese de produtos de baixo peso molecular, resultantes do metabolismo celular secundário, podendo ser convenientemente agrupados como glicosídeos, saponinas, taninos, antraquinonas, alcalóides, flavonóides, óleos essenciais e outros (CRAVEIRO & MACHADO, 1986). Os compostos do metabolismo secundário dos vegetais podem ser atrativos de insetos polinizadores ou repelentes de predadores ou ainda, atuar como inseticidas. Para o homem, esses compostos apresentam grande valor na cosmetologia, gastronomia, na industrialização de inseticidas e fármacos.

Tetradenia riparia (Hochst) Codd é uma planta empregada na medicina popular de Rwanda, conhecida popularmente como umuaravumba, cultivada ao redor das casas. As folhas são utilizadas, principalmente, como remédio para doenças como malária, angina, doença tropical de pele, gastroenterites, gonorréia, diarreia, abscessos dentários, dores de cabeça, bronquites, tosses, úlceras, esterilidade feminina, doenças renais, febres e outras (HOENE, 1970; VAN PUYELDE et al.1981; VAN PUYELDE et al.1986). No Brasil, a espécie *Tetradenia riparia*, foi introduzida como planta ornamental exótica e é cultivada em parques, jardins residenciais e hortos, distribuídas pelo Estado de São Paulo (ZELNIK et al.1978). Conhecida popularmente como incenso, lavândula, limonete, pluma-de-névoa ou falsa mirra é utilizada principalmente como ornamental. A planta exala um aroma intenso muito agradável.

Nas Lamiaceae, a morfologia, distribuição e frequência dos tricomas glandulares e a classe química dos compostos secretados têm sido usados como caracteres discriminativos em nível de subfamília ou em táxons inferiores à família (EL GAZZAR ; WATSON, 1970; ABU-ASAB ; CANTINO, 1987; CANTINO, 1990). A posição sistemática da espécie *Iboza riparia*, após minuciosos estudos, foi revista e verificou-se que as características apresentadas pelos exemplares se adequavam ao gênero *Tetradenia*. Em face disso, houve a mudança do gênero *Iboza* para o gênero *Tetradenia*, modificando o nome para *Tetradenia riparia* (CODD, 1983).

A produção de óleos essenciais nas plantas está geralmente associada à presença de glândulas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, ductos de óleo e resinas que contém grande quantidade de terpenos, considerados os sítios primários de acúmulo desse material. Há trabalhos com *Tetradenia riparia* que relatam substâncias isoladas das folhas, como ibozol e 8 (14), 15-sandaracopimaradieno - 2 α , 18-diol diterpenóides (ZELNIK, et al.1978); (VAN PUYELDE, et al.1987); umuravumbolida e diacetilboronolida α - pironas (VAN PUYELDE, et al.1981), 1',2'-dideacetilboronolida (β -pirona), sitosterol, stigmasterol e campesterol (esteróis) (ZELNIK, et al.1978), (VAN PUYELDE, et al.1986) e seu óleo essencial com, aproximadamente, 200 componentes (VAN DUNKEL et al.1990). Os diterpenóides apresentam atividade antimicrobiana, antiespasmódica e antitricomonas, sendo ainda inibidor do crescimento de raízes de trigo (VAN PUYELDE, et al., 1988).

O objetivo deste trabalho foi analisar a anatomia foliar por meio de estudos de microscopia de luz e de varredura, realizar análises histoquímicas e a atividade antibacteriana de extratos foliares de *T. riparia*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes vegetais estudados foram colhidos no Canteiro de Plantas Medicinais da ESALQ-USP, em Piracicaba. As populações de *T. riparia*, não receberam nenhum tratamento especial no seu cultivo. Com a finalidade de se estudar a histologia da lâmina foliar, foram coletadas folhas adultas do terceiro ou quarto nó, num total de dez indivíduos, colhidas no estágio vegetativo da planta

2.1-ESTUDOS DE MICROSCOPIA DE LUZ:

O preparo do material para obtenção do laminário histológico constituiu-se basicamente de processos usuais utilizados em microtomia: fixação em FAA 70% por 24 horas, desidratação em série alcoólica (etilica), infiltração em resina sintética, emblocamento, seccionamento, coloração e montagem de lâminas permanentes (Gerrits,1964). As peças incluídas em resina sintética foram seccionadas em micrótomo rotativo, obtendo-se seções transversais da lâmina foliar, com 4 μ m. Foi utilizado o corante azul de toluidina a 1% com borato de sódio 1%, em 100 ml de água destilada (O'Brien et al.1964). Paralelamente, foi efetuado um estudo da venação por meio da diafanização foliar, utilizando-se a técnica de Felipe & Alencastro (1966). As imagens foram obtidas por meio de um microscópio Axiolab® Zeiss, interligado a um Sistema de Análise de Imagens por Computador (SAIC), utilizando-se o Programa KS-100® 3.0 Zeiss ou ligado a um estereomicroscópio Stemi® SV-6 (Zeiss), que permitiu o registro dos cortes histológicos.

2.2-Estudos de Microscopia Eletrônica de Varredura:

O material foi fixado em uma solução de Karnovsky modificado, composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5% em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, 0,1M e água destilada, no vácuo por uma noite. Foram, então, feitas três lavagens com cacodilato 0,05 M, com duração de dez minutos cada e uma pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) por uma hora. O material foi desidratado com acetona, seguindo a série de concentrações: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, e levado à secagem até o ponto crítico, sendo fixado a um suporte por meio de adesivo condutor e, em seguida, metalizado (Danilatos, 1998).

2.3 Preparação do extrato bruto foliar para as análises químicas:

As folhas foram prensadas e desidratadas em estufa de secagem (até 45 °C), moídas em liquidificador e reservadas até a análise dos constituintes químicos.

3-Metodologia para a Análise Química

Utilizaram-se os solventes: EtOH, MeOH, Acetato e Hexano (grau técnico, purificado por destilação fracionada); H₂O ultrapura obtida em sistema Milli Q, da Millipore; Reagentes: H₃PO₄ (Synth), Trietilamina. (Vetec); Adsorventes: C-18 (Merck). O material foi pesado em balança analítica Mettler Toledo, modelo AG204; Ultra-som: ELMA, modelo TRANSSONIC 570, frequência 35 KHz.

Para CLAE-DAD empregou-se: cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian ProStar, configurado com os seguintes módulos: 1- Bomba ProStar 240; 2- Detetor UV/Vis com arranjo de diodos ProStar 330, 3- Injetor automático Prostar 410; 4- Microcomputador Dell com microprocessador Pentium III, 500MHz, com software Star Chromatography Workstation 5.52.

Procedimento geral de extração

Peso de 1,00 g de folhas secas e moídas de *Tetradenia riparia* em erlenmeyer (125 ml): adicionou-se 50 ml de EtOH (solvente), procedeu-se à sonicação em 30 minutos, filtrou-se e repetiram-se os itens anteriores. Retiraram-se 2 alíquotas de 5 ml, que foram secas.

Análise Cromatográfica:

Antes de ser analisada pela CLAE-DAD, uma alíquota do extrato foi submetida a um tratamento preliminar, etapa que envolve a eliminação de substâncias com caráter mais apolar, incluindo grande parte dos pigmentos.

Assim, pesou-se 1,5 g de C-18 (40-63mm) e preparou-se um cartucho com uma coluna de vidro (0,9 cm diâmetro). Condicionou-se com 3,0 ml do eluente MeOH: H₂O (95 : 05) e secou-se com ar comprimido. O extrato foi adubulizado em 1,0 ml do eluente; e aplicado na coluna, e efetuando-se eluição da amostra com 5,0 ml do eluente, filtrou-se em membrana Miliporeã (0,45 mm) e acondicionou-se em frasco para a CCD e para injeção automática (CLAE).

CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência):

A fração polar foi analisada em CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico. As condições cromatográficas para CLAE-DAD utilizadas nesse estudo estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 1. Parâmetros e condições físico-químicas da análise por CLAE-DAD.

Parâmetro	Condição
Coluna	Supelcosil®, C-18 µm, 250 x 4,6 mm
Fase móvel A (Tampão H ₃ PO ₄ / TEA 15 mM, pH 2,0) B (ACN - acetonitrila)	Gradiente Linear 5 - 100% de B (30 min) 100% de B (30 min) 5% de B (30 min) T = 63 min
Tempo de equilíbrio (min)	15
Fluxo (mL/min)	1
Comprimento de onda λ (cromatogramas) Faixa de aquisição espectral	254 nm e 270 nm 220-400 nm
Volume de injeção (µl)	20

2.4-Análise Antibacteriana

A caracterização prévia de possível efeito antimicrobiano do extrato do vegetal em referência, foi realizado a partir da preparação de suspensão homogeneizada a 1/10 em salina fosfatada tamponada estéril, para semeadura em orifícios preparados em placas de brain heart infusion Agar (oxid®), previamente inoculadas com as linhagem teste duplicadas, contendo o meio de cultura. Foram adicionadas v/v de concentrações seriadas de 1%,2%,4%,8%,16% e 32% do homogeneizado e semeadas em orifícios com 100 µl de uma suspensão de 1x 10⁷ unidades formadoras de colônias de uma linhagem bacteriana de *Escherichia coli* (U.177) e de *Staphylococcus aureus* (ATCC. 25.923), patogênicas de referência departamental (Departamento de microbiologia e imunologia – IBB-Botucatu-UNESP). As placas após o inóculo, foram incubadas durante 18h a 37°C, sendo observada a ocorrência ou não de efeito antibacteriano do homogeneizado frente à linhagem em estudo.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de *T. riparia* são dorsiventrals, anfiestomáticas, sendo comum a ocorrência de grandes câmaras subestomáticas na face abaxial (FIGURA 1A, B). A epiderme é unisseriada, com células irregulares, sendo as células da face adaxial maiores que as células epidérmicas da face abaxial (FIGURA 1 A-B), envolvida por cutícula e portadora de tricomas glandulares e não glandulares. Foram observadas muitas drusas no parênquima clorofiliano, principalmente entre as células do parênquima paliçádico (FIGURA 1B; 2B). O mesofilo apresenta o parênquima paliçádico bisseriado e o parênquima lacunoso, consta de aproximadamente três camadas de células irregulares (FIGURA 1 A-B). Os tricomas glandulares são capitados e peltados. Os glandulares capitados, são multicelulares, unisseriados, com uma célula basal, uma célula colar e com uma ou duas células apicais de forma ovóide, apresentando secreção densa, sendo que o tricoma de cabeça unicelular pode representar um estágio de desenvolvimento do tricoma com duas células apicais, os quais estão incrustados em cavidades tanto na epiderme adaxial, como na abaxial (FIGURA 2 A, B). Há também abundantes tricomas capitados com duas células basais epidérmicas, uma longa célula peduncular unisseriada, uma célula colar curta e com uma célula apical de forma globoide contendo a secreção (FIGURA 2C e 5 A).

Foi observada a presença de longos tricomas tectores unisseriados, localizados principalmente nas regiões das nervuras maiores (FIGURA 3 A e 5 B, C). Há também tricomas peltados inseridos principalmente na face abaxial da epiderme, constituídos por duas células basais epidérmicas, uma célula peduncular curta de parede espessa, uma célula colar e por um conjunto de células apicais secretoras, formadas por quatro a oito células, recobertas por cutícula (FIGURA 2 D).

A morfologia e distribuição de tricomas glandulares observados nas folhas de *T. riparia*, são características das Lamiaceae, como o principal local de secreções lipofílicas e corroboram com o trabalho de Vrachnakis (2003), que observou tricomas na parte aérea de *Origanum dictamnus* (Labiatae).

A região da nervura principal apresenta leve proeminência na superfície adaxial e forte proeminência na abaxial. Possui colênquima angular nas duas faces, adaxial e abaxial, sendo o parênquima fundamental formado por células isodiamétricas. O sistema vascular é do tipo colateral não contínuo, separado por células de parênquima (FIGURA 3 A-B).

Martins e Pastori (2004) realizaram análises anatômicas foliares e análises cromatográficas do óleo essencial de *Melissa officinalis* e identificaram a presença de dois tipos de tricomas secretores: peltado e capitado, além da presença de tricomas tectores. O tricoma capitado, identificado como tipo 1, apresenta variações na sua morfologia em relação ao número de células pedunculares e ao número de células secretoras apicais, sendo que a análise cromatográfica do óleo essencial, identificou a presença de monoterpênicos, em dois componentes majoritários, responsáveis por mais de 87,8% da composição relativa no óleo bruto, além de sesquiterpenos em menor proporção. Martins e Martins (2003) observaram através de estudos de M.L. e de M.E.V., três tipos morfologicamente distintos de tricomas em *Mentha pulegium X spicata* (Labiatae), sendo dois glandulares (peltado e capitado) e um não glandular (tector). O tricoma capitado tipo I, apresentou-se com uma célula basal, uma célula peduncular e uma célula apical de forma alongada com duas depressões laterais simétricas mostrando a cutícula mais fina. O tricoma peltado apresentou uma célula basal, uma célula peduncular e um conjunto de células apicais secretoras dispostas radialmente, recobertas por cutícula. Os tricomas tectores apresentam-se de duas formas: unisseriados, simples e bifurcados, ambos multicelulares, nos quais ocorrem ornamentações na cutícula.

Martins (2002) analisou folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata X suaveolens* em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura e observou que os tricomas capitados em ambas as espécies são classificados como do tipo I, apresentando uma célula basal, uma célula peduncular e uma grande célula apical, cujo formato varia de circular a periforme. Os tricomas peltados, são formados por uma célula basal, uma célula peduncular curta, larga e unicelular, com paredes externas cutinizadas e uma cabeça grande, multicelular com doze células secretoras, distribuídas radialmente em dois círculos concêntricos, o central com quatro células e o externo com oito células, as quais acumulam o produto da secreção em uma cavidade entre a cutícula e as células secretoras. Cavaleiro et al. (2002), estudaram os tricomas de *Teucrium salviastrum* e observaram a presença de tricomas peltados e capitados tanto nos órgãos vegetativos como nos órgãos reprodutivos. O estudo enfatizou os tricomas capitados com longos pedúnculos multicelulares abundantes,

sendo que o material secretado por eles é liberado pela ruptura da cutícula no topo da célula apical (cabeça). Em *Tetradenia riparia* também foram observados abundantes tricomas capitados com longo pedúnculo unisseriado (FIGURA 2 C e 5A)

Belzic, et al. (2001) estudaram anatomicamente a estrutura do aparato glandular de *Satureja cuneifolia* Ten. (Labiatae) e observaram que a glândula peltada apresenta base unicelular, um pedúnculo unicelular e doze células formando a célula apical (cabeça). Há diferença entre a inserção da glândula peltada de *Satureja cuneifolia* (Labiatae), quando comparada com a glândula peltada de *T. riparia* (Labiatae), sendo que o tricoma peltado de *Tetradenia* apresenta base bicelular e em *Satureja*, base unicelular. Sossae (1995), em estudos anatômicos em folhas jovens e adultas de *T. riparia*, identificou cinco tipos de tricomas capitados, o tipo A é caracterizado por apresentar uma célula apical ovóide, o tipo B por possuir duas células apicais ovóides, o tipo C com uma célula apical globóide e os tricomas do Tipo D e E apresentam um número variável de células e são maiores do que os dos tipos A, B e C. Os tricomas peltados foram diferenciados em dois tipos. O tipo F composto por quatro a oito células apicais secretoras e o tipo G, com oito a dez células apicais.

A possível explicação para essa pequena variação é que neste trabalho foram realizados estudos com folhas adultas, no estágio vegetativo e foram encontrados dentre os tricomas capitados somente os correspondentes aos capitados do tipo A, B, C, não apresentando o tipo D e E (FIGURA 2 A,B,C). Em relação aos tricomas peltados em folhas adultas somente foi encontrado o tricoma correspondente ao tipo F, não sendo encontrado o tipo G (FIGURA 2 D).

Ascensão, Mota e Castro. (1999) observaram cinco tipos morfológicos de tricomas glandulares em *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae), sendo o tricoma peltado confinado à superfície abaxial da folha. Neste trabalho, em *T. riparia*, foram observados quatro tipos morfológicos de tricomas glandulares, dos quais, três tipos são variações morfológicas dos tricomas capitados: os tricomas capitados com uma célula apical (FIGURA 2 A,C), os tricomas capitados com duas células apicais (FIGURA 2B) e os capitados com longa célula peduncular unisseriada (FIGURA 2C), além do tricoma peltado que se distribui somente na epiderme abaxial da folha (FIGURA 2 D), o que também ocorre em *Plectranthus ornatus*.

Em *Tetradenia riparia* o tricoma capitado também é distribuído em ambas as superfícies da folha, porém observam-se três tipos morfológicos distintos: o tricoma glandular capitado com cabeça unicelular, o tricoma capitado com cabeça bicelular, o primeiro pode representar um estágio de desenvolvimento do segundo, além da presença de abundantes tricomas capitados com longo pedúnculo unisseriado, inseridos em duas células basais epidérmicas, sendo a secreção de aspecto heterogêneo localizada na célula apical, entre o espaço subcuticular (FIGURA 2 A-C). Antunes et al. (1997) estudaram em MEV a morfologia e a distribuição de tricomas em órgãos vegetativos e reprodutivos de duas espécies endêmicas de *Teucrium* (*T. betonicum* e *T. heterophyllum*) e observaram a presença de tricomas não-glandulares longos, morfológicamente diferentes e três tipos de tricomas glandulares, diferentemente distribuídos, dependendo do órgão estudado. Em *Tetradenia riparia* também foram observados nas folhas, a presença de longos tricomas não-glandulares (tectores), distribuídos em ambas as faces da epiderme, porém mostrando maior incidência nas regiões das nervuras .

As folhas de *T. riparia* são simples, membranáceas, pilosas, elípticas com lóbulos de ápice agudo. Sistema de nervura pinada com venação reticulada poligonal regular (FIGURA 4 A-B).

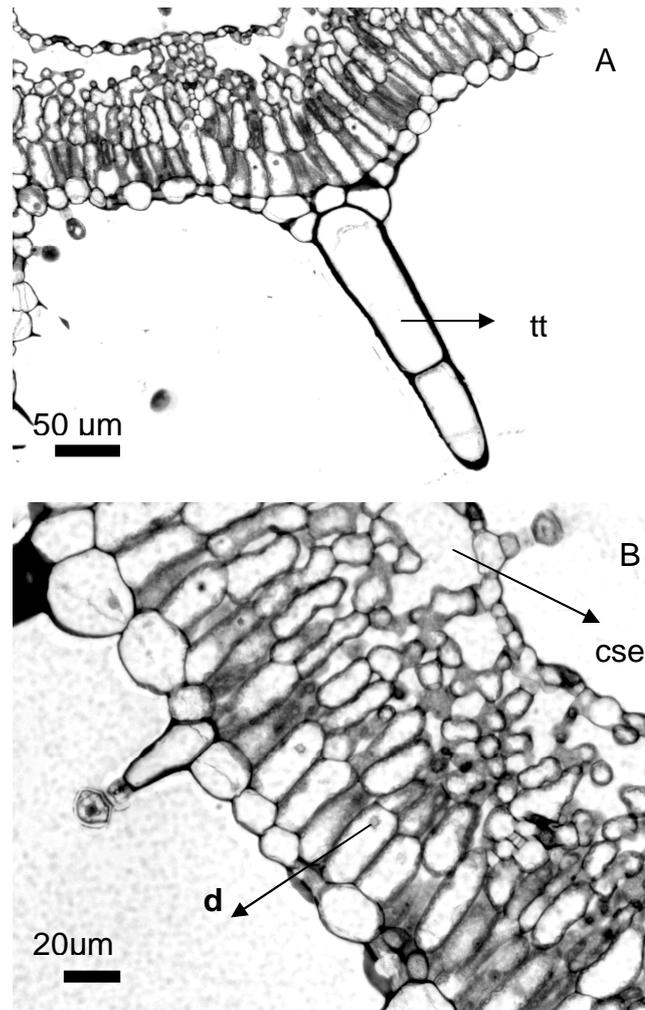


FIGURA 1 - Secção transversal da folha de *Tetradenia riparia* L. A- *Tricoma tector* na superfície adaxial da epiderme. Observar estômatos com grande câmara substomática na epiderme abaxial. B - Mesofilo dorsiventral, presença de drusas no parênquima paliçádico. Tricomas capitados em ambas as faces da epiderme. cse- Câmara substomática; tt= tricoma tector; d= drusa.

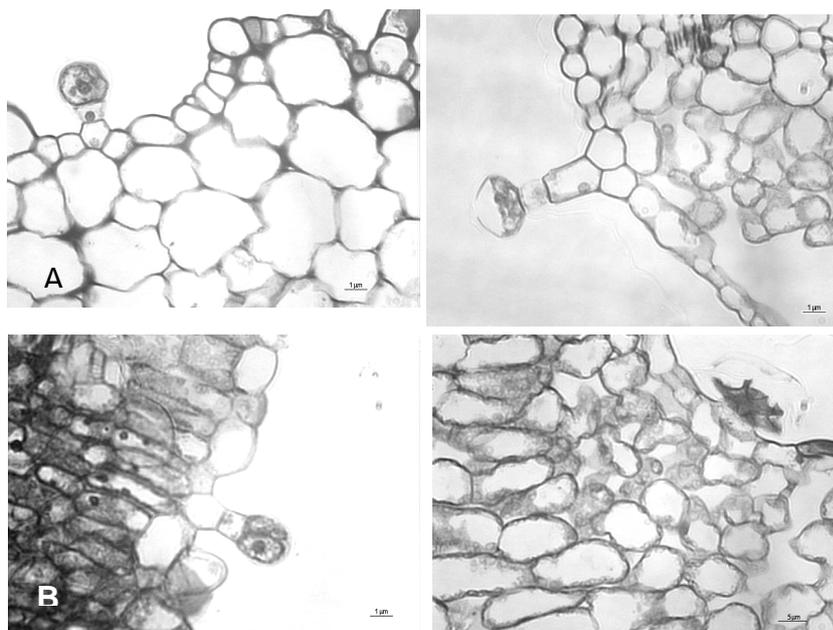


FIGURA 2 - Secção transversal da lâmina foliar de *Tetradenia riparia* L.

- A- Detalhe do tricoma capitado formado por uma célula basal epidérmica, uma célula colar e por uma única célula apical, constituindo a cabeça.
- B- Detalhe do tricoma capitado com duas células apicais secretoras constituindo a cabeça.
- C- Detalhe do tricoma capitado com duas células basais epidérmicas, uma célula peduncular, uma célula colar e uma célula apical com secreção heterogênea visível.
- D- Detalhe do tricoma peltado, com duas células basais epidérmicas, uma célula peduncular curta de parede grossa e um conjunto de células apicais secretoras (quatro a oito células) de forma achatada constituindo a cabeça da glândula, a qual é revestida por cutícula.
- S= secreção heterogênea.

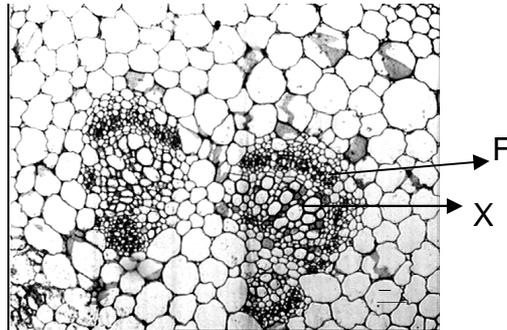


FIGURA 3 - Detalhe do feixe vascular da nervura (colateral descontínuo) de *Tetradenia riparia*
X = xilema; f = floema.

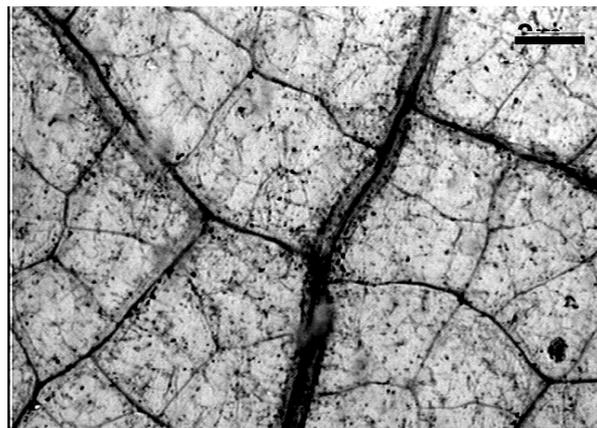


FIGURA 4 - Folha diafanizada de *Tetradenia riparia* L. A - Detalhe das nervuras (primárias e secundárias).

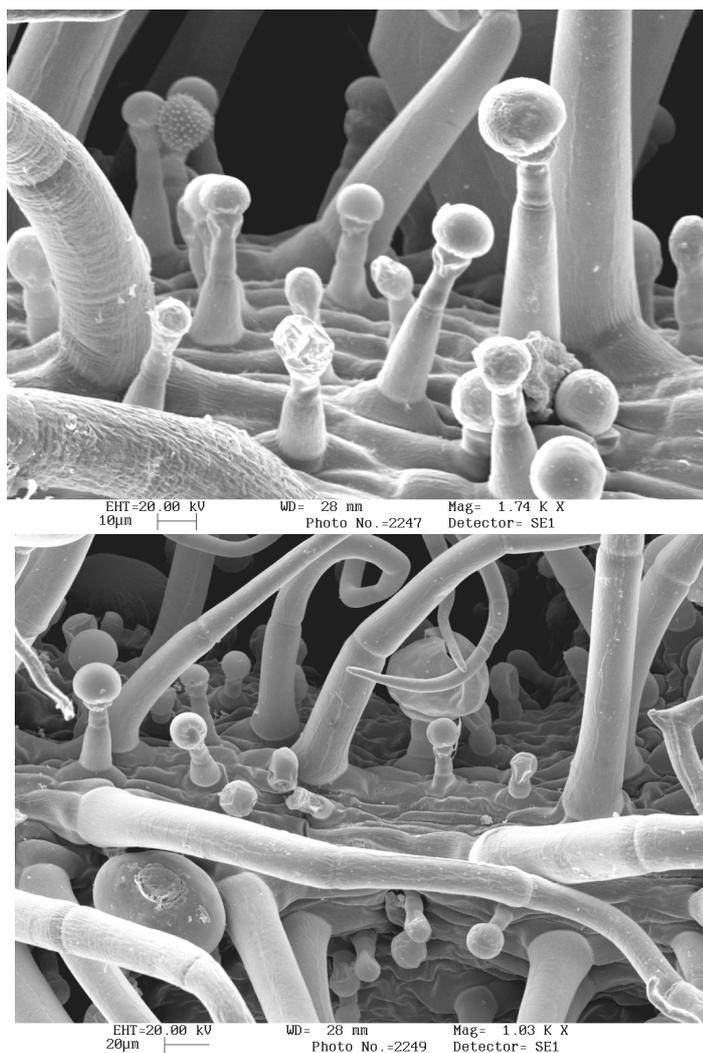


FIGURA 5 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da superfície abaxial da folha de *Tetradenia riparia* L. A - Detalhe da nervura com tricomas capitados e tectores; B- Detalhe da nervura com vários tricomas capitados, tectores e peltado ; C -Vista da superfície da epiderme abaxial com grande inserção de tricomas tectores e capitados inseridos nas nervuras maiores e observação de tricomas capitados e peltados entres as nervuras menores. tt= tricoma tector; tp= tricoma peltado.

3.2- Análises Químicas dos compostos

-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Os estudos fitoquímicos já realizados com espécies de *Tetradenia*, levaram ao isolamento e caracterização estrutural de α -pironas (VAN PUYVELDE ; DE KIMPE, 1998; DAVIES-COLEMAN ; RIVETT, 1995; FRANCA ; POLONSKY.,1971; HAKIZAMUNGU et al.,1988; VAN PUYVELDE ET AL., 1987); (Figuras 7 e 8).

O extrato etanólico de folhas de *Tetradenia*, após tratamento preliminar por extração em fase sólida (EFS-C18) para eliminação de interferentes lipofílicos, foi analisado por CLAE-DAD, munido de coluna de fase reversa C18. O objetivo desta análise foi avaliar a complexidade do perfil químico desse extrato e obter informações preliminares sobre classes de substâncias presentes, por meio de espectros no UV obtidos para os principais picos cromatográficos.

Considerando que α -pironas como aquelas ilustradas na figura 7 apresentam absorção máxima em cerca de 255 nm (DAVIES-COLEMAN ;RIVETT, 1995), pode-se propor a partir dos espectros obtidos em CLAE-DAD (figura 9) que o pico 12 pertence a essa classe de substâncias. Os espectros no UV obtidos para os picos 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 poderiam ser atribuídos, muito preliminarmente, a substâncias flavonoídicas ou a ésteres de ácido cafeico, conforme espectros UV ilustrados na figura 8.

Para os demais picos cromatográficos, não foi possível ainda relacionar os respectivos espectros no UV com alguma classe de metabólito secundário.

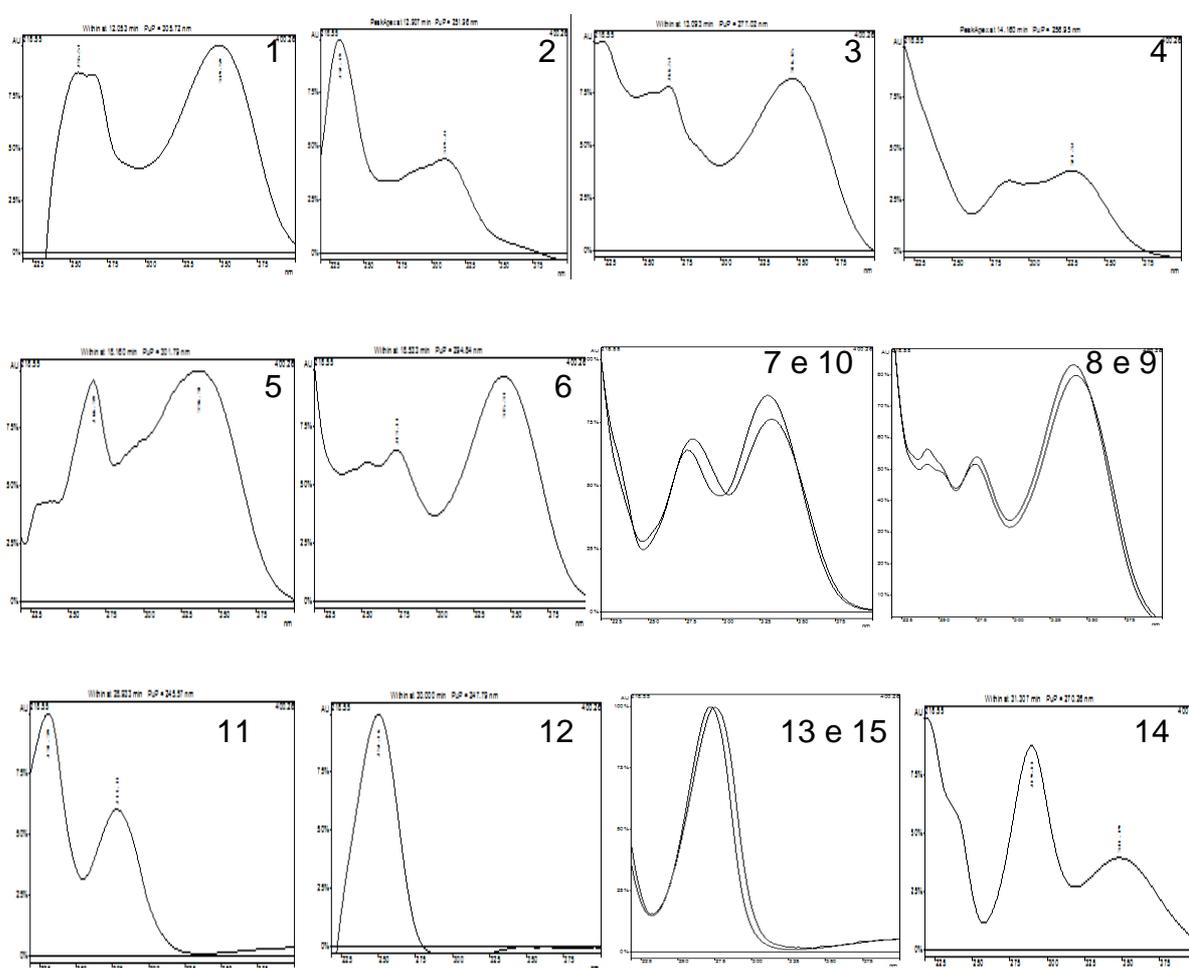
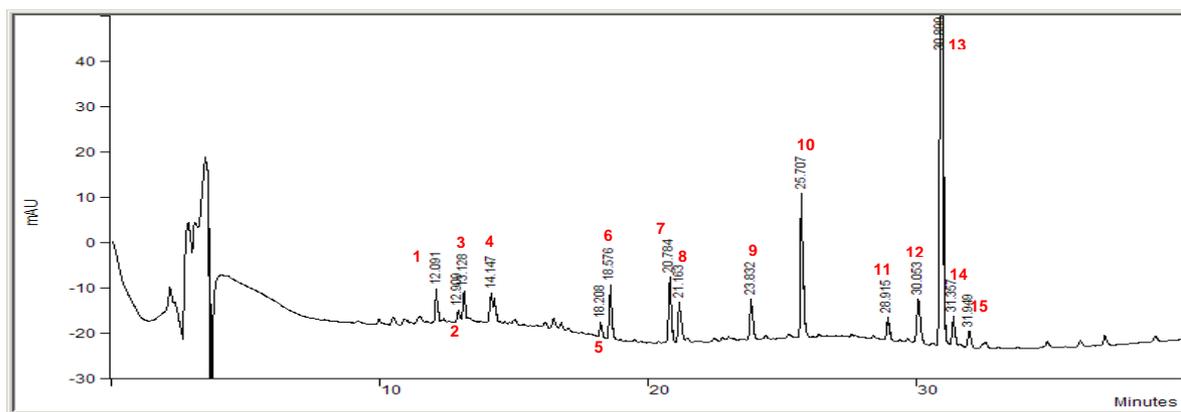


Figura 9. Cromatogramas do extrato etanólico de folhas de *Tetrademia*, obtidos em CLAE-DAD e registrado a 254 nm. Abaixo os espectros no UV dos picos 1 a 15, na região de 220 a 400 nm.

Sossae (2000), através de estudos de cromatografia em camada delgada e na cromatografia em fase gasosa, verificou a presença de carofileno, eugenol, limoneno, iso-eugenol, metil-eugenol, α -pineno, β -pineno, constituindo 67,3% dos componentes presentes no óleo essencial produzidos de primórdios foliares e de folhas jovens e adultas de *T. riparia*, conforme os estudos também apresentados por Werker, et al.(1985); Werker, et al. (1993) e Zelnik et al. (1978), em várias espécies da família Labiatae, também relatados para estas espécies.

Cavaleiro et al. (2002), estudaram a composição do óleo essencial de *Teucrium salviastrum* (Labiatae) usando principalmente GC e GC-MS. Os óleos isolados das folhas coletadas durante a floração e pós-floração

exibiram composição química similar. Entretanto, o óleo mostrou diferenças na composição quando comparado com outros reportados na literatura para algumas espécies. O estudo mostrou que o óleo consiste principalmente de E-beta-farnesene (26,1 - 29,3%), E-caryophyllene (19,1 - 24,1%) e ermacrene D (13,7 - 21,6%). BEZIC, et al. (2001), estudaram os constituintes do óleo essencial de *Satureja cuneifolia* (Labiatae) por GC-MS, observando que o óleo essencial apresentou linalool, carvacrol e p-cymene como constituintes principais.

Omolo et al. (2004), estudaram o óleo essencial de seis plantas crescidas no Quênia, quanto a atividade repelente ao *Anopheles gambiae*. O óleo de *Conyza newii* (Compositae) e *Plectranthus marrubioides* (Labiatae) foram os mais repelentes, seguidos por *Lippia javanica* (Verbenaceae), *Lippia ukambensis* (Verbenaceae), *Tetradenia riparia*, *Iboza multiflora* (Labiatae) e *Tarchonanthus camphoratus* (Compositae), sendo oito constituintes dos diferentes óleos (perillyl alcohol, cis-verbenol, cis-carveol, geraniol, citronellal, perillaldehide, caryophyllene oxide e um álcool sesquiterpeno) exibiram relativamente alta repelência.

Van Puyelde ; De Kimpe (1998) isolaram alpha-pyrone, tetradenolide, de folhas de *T. riparia* e com base nas análises espectroscópicas, identificaram o composto como 5,6- dihydro-6-(1,2-dihydroxyhexyl)-2 pyrone.

Campbell et al. (1997) identificaram 35 componentes do óleo essencial das folhas e caules de *T. riparia*, analisados por GC e GC/MS, sendo que os principais são alpha-terpineol (22,6%), fenchone (13,6%), beta-fenchyl alcohol (10,7%), beta-caryophyllene (7,9%) e perillyl alcohol (6,0%)

Bisio et al. (1999) realizaram análise química do óleo essencial e do extrato da folha de *Salvia blepharophylla* (Labiatae), através de GC-MS , mostrando no óleo um complexo produto de secreção. Os componentes eugenol, cis-3-bexenyl benzoate, cis-jamone, trans-nerolidol, benzyl álcool e c-19-c-23 n-alcanos foram os principais componentes identificados, entretanto os flavonóides nuchensin e pedaltin, o neoclerodane diterpenoide salvianuline D, e triterpenóides do ácido ursolic e alpha -amyryn foram isolados do extrato foliar.

3.3- Atividade antimicrobiana

TABELA 2. Atividade antibacteriana do extrato bruto aquoso de *Tetradenia riparia*.

Relação V/V – Homogeneizado/solução salina tamponada.

(+) inibição do crescimento bacteriano;(-) crescimento bacteriano.

	1%	2%	4%	8%	16%	32%
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram-positiva)	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (gram-negativa)	+	+	+	+	+	+

Em relação aos testes microbiológicos do ensaio preliminar foi possível verificar que o extrato bruto aquoso de *T. riparia* apresentou atividade inibitória para *E. coli* e para *S. aureus* em todas as concentrações testadas, não havendo crescimento das bactérias nas placas. Sendo assim, Através desta análise, sugere-se continuar os testes para determinação da concentração inibitória mínima e curva de sobrevivência. SOSSAE (2000), observou propriedades bactericidas e fungicidas no óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia*, sugerindo ser necessária a realização de testes biológicos, com verificação dos tipos de bactérias e fungos sensíveis. Hajhashemi et al. (2003), estudaram extratos de folhas de *Lavandula angustifolia* Mill., confirmando o uso no tratamento de condições inflamatórias.

Scott; Springfield e Coldrey (2004) realizaram estudos farmacodiagnóstico em 26 espécies de plantas da África do Sul usadas na medicina tradicional, sendo que o resultado dessa pesquisa focalizou em particular 26 espécies entre as Asteraceae, Geraniaceae e Lamiaceae. Os resultados dessa investigação mostraram eficácia a agentes antimicrobianos reportados. Shale; Stirk e Van Staden. (2005) observaram que extratos de *Malva parviflora* em hexano, metanol e água inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gran-negativas.

Ricci et al. (2005) determinaram a composição química do óleo essencial de *Teucrium marum* subsp. *marum* (Labiatae), através de cromatografia gasosa, identificando 30 compostos, dos quais: isocaryofileno , β-bisaboleno, β-sesquifelandrene, α-santalene, dolicodial e α-cariofileno como componentes principais, sendo também observada a atividade antimicrobiana do óleo essencial para quatro fungos patogênicos .

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos estudos da anatomia foliar, composição química e atividade antibacteriana de folhas de *T. riparia*, pode-se concluir que:

- 1- Folha dorsiventral, anfiestomática, com ocorrência de grandes câmaras subestomáticas na face abaxial. A epiderme é unisseriada, com células irregulares sendo as células da face adaxial maiores que as da face abaxial.
- 2- Há 3 tipos de tricomas: tricomas glandulares capitados, com diferentes morfologias; tricomas glandulares peltados, além de longos tricomas tectores.
- 3- Ocorrência de drusas no parênquima clorofiliano.
- 4- O sistema vascular é do tipo colateral não contínuo, separado por células de parênquima.
- 5- Pelo espectro obtido em CLAE-DAD, constatou-se a possibilidade da presença da classe de substâncias α -pirona.
- 6- Os espectros no UV obtiveram picos que poderiam ser atribuídos, preliminarmente, a substâncias flavonoídicas ou a ésteres (ácido cafeico).
- 7- O extrato aquoso foliar mostrou efeito antibacteriano para *E. coli* e *S. aureus* em todas as concentrações usadas, mostrando que a planta apresenta potencial antibacteriano e terapêutico.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, T. et al. Morphology and distribution of trichomes in two endemic *Teucrium* species of Macaronesia. *Acta Botanica Gallica*, Chatenay Malabry, v. 144, n. 3, p. 363-369, 1997.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. D. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, London, v. 84, n. 4, p. 437-447, 1999.
- ABU-ASAB, M.S.; CANTINO, P. D. Phylogenetic implications of leaf anatomy in subtribe Melittidinae (Labiatae) and related taxa. *Journal of the Arnold Arboretum*, Cambridge, n. 68, p. 1-34, 1987.
- BEZIC, N.; DUNKIC, V.; RADONIC, A. Glandular apparatus structure and essential oil constituents of *Satureja cuneifolia* Ten. *Acta Biologica cracoviensia series Botanica*, Kracow, n. 43, p. 65-68, 2001.
- BIENVENU, E. et al. Anticonvulsant activity of aqueous extract of *Leonotis leonurus*. *Phytomedicine*, Jena, v. 9, p. 217-223, 2002.
- BISIO, A. et al. Glandular hairs secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandege ex Epling grow in Italy. *Annals of Botany*, London, v. 83, n. 4, p. 441-452, 1999.
- CAMPBELL, W.E. et al. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 63, n. 3, p. 270-272, 1997.
- CANTINO, P.D. The phylogenetic significance of stomata and trichomes in Labiatae and Verbenaceae. *Journal of the Arnold Arboretum*, Cambridge, n. 71, p. 323-370, 1990.
- CAVALEIRO, C. et al. Composition of the essential oil and micromorphology of trichomes of *Teucrium salviastrum*, an endemic species from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, Chichester, v. 17, n. 4, p. 287-291, 2002.
- CODD, L.E. The genus *Tetradenia* (Lamiaceae) 1. African species. *Bothalia*, Pretoria, n. 14, p. 177-184, 1983.
- CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 23, p. 54-58, 1986.
- DANILATOS, G.D. Foundations of environmental scanning electron microscopy. *Advances in Electronics and Electron Physics*, New York, n. 71, p. 109-205, 1998.
- DAVIES-COLEMAN, Michael. T.; RIVETT, D.E.A. Structure of the 5,6-dihydro-2-pyrone, *umuravum* bolide. *Phytochemistry*, New York, v. 38, n. 3, p. 791-192, 1995.
- EL GAZZAR, A.; WATSON, L. A taxonomic study of Labiatae and related genera. *The New Phytologist*, Cambridge, n. 69, p. 451-486, 1970.

- FELIPE, G. M.; ALENCASTRO, F. M. M. R. Contribuição ao estudo da nervação foliar das compostas do cerrados. I-Tribos Helinieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecioneae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, n. 38, p. 125-158, 1966. Suplemento.
- FRANCA, N.C.; POLONSKY, J. Structure of boronolide isolated from *Tetradenia fruticosa*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. Serie C: Sciences Chimiques*, Paris, v. 273, n. 5, p. 439 - 41, 1971.
- GERRITTS, P.O. *The application of glycol metacrylate in histotechnology: some fundamental principles*. Germany: Leica GmbH, 1964.
- HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A. ; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne , n. 89, p. 67-71, 2003.
- HAKIZAMUNGU, E. Active principles of *Tetradenia riparia*. III. Anti-trichomonas activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7 α ,18-diol. *Phytotherapy Research*, London, n. 2, v. 4, p. 207-208, 1988.
- HAMBURGER, M. ; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, New York , v. 30, n. 12, p. 3864 -3874, 1991.
- HOENE, F.C. Plantas e Substâncias Vegetais tóxicas e Medicinais. São Paulo. Graphisars. p.315-318, 1939
- MARTINS, M.B.G. Biometria tecidual e identificação dos tricomas secretores presentes em *Mentha spicata* e em *Mentha spicata* X *suaveolens* (Lamiaceae). *Revista Hispeci & Lema*, Bebedouro, n. 6 p. 43 - 48, 2002.
- MARTINS, M.B.G.; MARTINS, A. R. Caracterização histológica de folhas de *Mentha pulegium* X *spicata* (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 33 - 39, 2003.
- MARTINS, M.B.G. ; PASTORI, A. P. Anatomia Foliar com ênfase nos tricomas secretores e análise cromatográfica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 6 , n.2, p. 77 - 82, 2004.
- O'BRIEN, T. P. et. al Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, New York, n. 59, p.368 - 73, 1964.
- OMOLO, M.O. et. al.Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, New York, v. 65, n. 20, p. 2797 - 2802, 2004.
- RICCI, D. et. al. Chemical composition, antimicrobial , antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 98, n. 1-2,p. 195-200, 1995.
- SCOTT, G.; SPRINGFIELD, E.P. ; COLDREY, N. A pharmacognostical study of 26 South African plant species used as traditional medicines. *Pharmaceutical Biology*, Lisse, v.42, n. 3, p. 186 - 213, 2004.
- SHALE, T. L.; STIRK, W.A., VAN STADEN, J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 96, n. 1-2, p. 325 - 330, 2005.
- SOSSAE, F.C. Anatomia e fitoquímica foliar de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. 1995. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.
- SOSSAE, F.C. Ultra-Estrutura dos Tricomas Glandulares e Composição do óleo essencial em folhas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. 2000. 107f. Tese Doutorado- Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995
- VAN DUNKEL, F. et. al. Antimicrobial and insectidal activity of essential oil from leaves of *Tetradenia riparia*. *Planta medica*, Stuttgart, n. 56, p. 645, 1990.
- VAN PUYVELDE, L.; De KIMPE, N. Tetradenolide, an alpha pyrone from *Tetradenia riparia*. *Phytochemistry*, New York, v. 49, n. 4, p. 1157 - 1158, 1998.
- _____, De KIMPE, N. et al. 1', 2',-ideacetylboronolide, α - Pyrone from *Iboza riparia*. *Phytochemistry*, New York, n. 20, p. 2753 - 2755, 1981.

- _____. et al. Active principles of *Tetradenia riparia*. 2. Antispasmodic activity of 8(14), 15-Sandaracopimaradiene-7- α , 18-Diol. *Planta Medica*, Stuttgart, n. 2, p. 156 - 158, 1987.
- _____. et al. Active principles of *Tetradenia riparia*. I. Antimicrobial activity of 8(14), 15-sandaracopimaradiene-7 α ,18-diol. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, n. 17, p. 269 - 275, 1986.
- _____. et al. 8(14), 15-Sandaracopimaradiene-2 α ,18-diol, a minor constituent of the Rwandese medicinal plant *Tetradenia riparia*. *Phytochemistry*, New York, v.26, n. 2, p. 493 - 495, 1987.
- HAKIZAMUNGU, E., SCHAMP, N. Wheat rootlet growth inhibition test of rwandese medicinal plants: active principles of *Tetradenia riparia* and *Diplolophium africanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 24, p. 233 - 246, 1988.
- VRACHNAKIS, T. Trichomes of *Origanum dictamnus* L. (Labiatae). *Phyton- Annales Rei Botanicae*, Horn, v. 43, n. 1, p. 109 - 133, 2003.
- WERKER, E.; RAVID, V.; PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hair and identification of the main components their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany*, Jerusalem, n. 34, p. 31 - 45, 1985.
- _____, PUTIEVSKY, E.; RAVID, V. Glandular hairs and essential oil developing leaves of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, London, n. 71, p. 43 - 50, 1993.
- ZELNIK, R. et. al. Ibozol, a new diterpenoid from *Iboza riparia*. *Phytochemistry*, New York, n. 17, p. 1795 - 1797, 1978.