

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO DE FOLHAS DE *Ocimum gratissimum* L.

Sheila Nakashima dos Santos

Araraquara/SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO DE FOLHAS DE *Ocimum gratissimum* L.

Sheila Nakashima dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Araraquara/SP

2013

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que tornou tudo isso possível. À minha família, principalmente, minha mãe, Leonor Kioko Nakashima dos Santos, que sempre acreditou no meu potencial, me apoiando e amparando em todas as minhas decisões e situações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo cuidado e carinho que só Ele tem me proporcionado. Agradeço ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento pela orientação, pela paciência e pela oportunidade que ele me deu de realizar esse trabalho. Agradeço ao Pedro Donizeti Nogueira que cuida de todas as plantas do Horto, inclusive a planta que estudei. Agradeço ao MSc. Juhan Augusto Scardelato Pereira e à Maria Angélica Lima Barretto, técnica do laboratório de Botânica da FCF, que me mostraram as técnicas utilizadas. Agradeço ao meu amigo Mun-Há e sua família que me acompanharam e me apoiaram durante toda a realização do trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1. A Família Lamiaceae (Labiatae)	11
2.2. O gênero <i>Ocimum</i>	12
2.3. A espécie <i>Ocimum gratissimum</i> L.	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Material	14
4.2. Estudo anatômico	14
4.3. Estudo histoquímico	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. Estudo anatômico	17
5.1.1. Anatomia macroscópica	17
5.1.2. Anatomia	17
5.2. Estudo histoquímico	21
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	25

RESUMO

A Humanidade sempre recorreu às plantas, não apenas para se alimentar, mas para aliviar dores ou curar suas doenças, e aquelas que apresentam essas propriedades farmacológicas são conhecidas como plantas medicinais. Atualmente, considerando o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, sabe-se que essas propriedades são resultados de substâncias conhecidas como metabólitos secundários. Porém, mesmo com todo avanço do conhecimento, pouco se estudou sobre essas plantas e seu uso pode se tornar perigoso sem a devida orientação, pois muitas plantas apresentam difícil identificação aumentando as chances de uma grave intoxicação.

Diante da necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre o assunto, escolheu-se executar um estudo anatômico e histoquímico de *Ocimum gratissimum* L. pelo aspecto medicinal-popular de seu uso e, sobretudo para incrementar informações farmacobotânicas a seu respeito, pois a maioria dos estudos encontrados na literatura discutem sobre o cultivo, colheita, composição química e propriedades farmacológicas e, poucos sobre a anatomia e histoquímica das folhas.

Nesse estudo foi possível confirmar dados encontrados na literatura de forma a reforçar as referências para análises de autenticidade de folhas de *O. gratissimum* L., pois observou-se a presença de tricomas tectores pluricelulares não ramificados e uni seriados, tricomas secretores peltados e tricomas secretores pedunculados, e apresentam estômatos diacíticos. Também foi observado que as folhas podem fornecer diversos compostos que podem apresentar atividades biológicas importantes e que há indícios que os compostos lipofílicos localizados no interior dos tricomas secretores peltados e pedunculados apresentam características físico-químicas diferentes.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Ocimum gratissimum</i> L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas "Prof ^a . Dra. Célia Cebrain Araújo Reis" da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, UNESP, Campus de Araraquara, SP.	12
2	Vista dorsal e ventral da folha de <i>Ocimum gratissimum</i> L..	17
3	Fotomicrografias do aspecto anatômico de folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> L.. A: nervura central com destaque na distribuição do xilema (xl) e do floema (fl); B e C: região do mesofilo, com destaque do parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl) em C; D: região do colênquima (co) da nervura central; E: nervura central com destaque na região de transição entre o mesofilo e o colênquima; F: distribuição de cristais na região do mesofilo sob luz polarizada; G: detalhe dos cristais sob luz polarizada; H: região do mesofilo contendo cristais (seta). Barras: A, B e F - 100µm; C, D e E - 50µm; G e H - 16µm.	19
4	Fotomicrografias do aspecto anatômico detalhado de folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> L.. A: tricoma glandular pedunculado; B: tricoma tector pluricelular não ramificado e uni seriado; C: tricoma glandular ou peltado; D: região do mesofilo com destaque para a forma de inserção dos tricomas glandulares peduncular e ; E: destaque do mesofilo com uma fenda estomática (seta); F: estômatos diacíticos em detalhe. Barras: A, B, C, D, E e F - 32µm. . .	20
5	Fotomicrografia apresentando os resultados histoquímicos positivos para substâncias apolares de <i>Ocimum gratissimum</i> L.. A: controle Sudam III; B: resultado positivo para lipídios totais evidenciado no tricoma glandular ; C: controle sulfato azul do Nilo; D: resultado positivo para lipídios ácidos no tricoma glandular pedunculado e para lipídios neutros no tricoma glandular ; E: controle reagente NADI; F: resultado positivo para óleos essenciais no tricoma glandular ; G: controle tricloreto de antimônio; H e I: resultado positivo para esteróides em tricoma glandular pedunculado e tricoma glandular , respectivamente; J: controle ácido sulfúrico + glicerina; H:	

	resultado positivo para lactonas sesquiterpênicas na região superficial do colênquima; L: controle 2,4-dinitrofenilhidrazina; M: resultado positivo para terpenoides com grupo carbonila na face adaxial da epiderme. Barras: A, C, E, F, J, K e L - 50µm; B, D, H, I e M - 32µm.....	22
6	Fotomicrografia apresentando os resultados histoquímicos positivos para substâncias polares de <i>Ocimum gratissimum</i> L.. A: controle cloreto férrico; B: resultado positivo para compostos fenólicos na região do mesofilo; C: controle ácido clorídrico; D: resultado positivo para flavonoides na região do mesofilo; E: controle dicromato de potássio; F: resultado positivo para compostos fenólicos nas faces adaxial e abaxial da epiderme; G: controle Dragendorff; H: resultado positivo para alcaloides na região do mesofilo. Barras: A, B , E, F, F e H - 50µm; C e D - 32µm.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Reagentes utilizados para a detecção de compostos apolares, suas funções e suas respectivas referências bibliográficas.	16
2	Reagentes utilizados para a detecção de compostos polares, suas funções e suas respectivas referências bibliográficas.	16
3	Resultados dos estudos histoquímicos dos cortes transversais da folha de <i>Ocimum gratissimum</i> L.. . . .	21

1. INTRODUÇÃO

A Humanidade sempre recorreu às plantas, não apenas para se alimentar, mas para aliviar suas dores ou curar doenças, e as plantas que apresentam essas propriedades farmacológicas são conhecidas como plantas medicinais. Atualmente considerando o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, sabemos que essas propriedades são resultados de substâncias que elas produzem conhecidas como metabólitos secundários. Porém, mesmo com todo esse avanço do conhecimento, pouco se estudou sobre essas plantas.

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2013), o Brasil detém de 15 a 20% da biodiversidade mundial em seu território. Dentro dessa parcela, encontram-se diversas plantas medicinais utilizadas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos e também utilizadas em remédios caseiros na medicina popular tradicional. Porém, esse recurso natural ainda é pouco conhecido e pouco aproveitado pela sociedade brasileira, pois se estima que sejam pelo menos 250 mil espécies e acredita-se que metade apresente propriedades farmacológicas.

Segundo Veiga-Junior & Pinto (2005), o consumo popular dessas plantas medicinais vem acontecendo com pouca ou nenhuma comprovação farmacológica, onde 82% da população brasileira utilizam produtos à base de espécies vegetais (Yunes et al., 2001). Essa prática pode se tornar bastante perigosa quando realizada sem orientação, pois muitas plantas podem apresentar difícil identificação, composição química variável ou ainda relativa toxicidade (Oliveira & Akisue, 1997; Simões et al., 2007). Os nomes populares das plantas variam muito nas diferentes regiões do país, bem como um mesmo nome pode indicar diversas espécies diferentes, o que pode se transformar em sério fator de erro no uso de plantas medicinais (Oliveira & Akisue, 1997). Dessa forma, análises botânicas e químicas de espécies vegetais são de suma importância para a identificação e controle de qualidade farmacognóstico de plantas medicinais (Simões et al., 2007; Farmacopéia Brasileira, 2010).

Com base nesses dados e reconhecendo a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre essa biodiversidade, algumas universidades brasileiras tem se dedicado ao estudo dessas plantas. Esse trabalho visa auxiliar de forma simples,

prática e objetiva esses estudos, levando em consideração que, antes de tudo, é necessário saber reconhecer a planta medicinal que se pretende estudar, evitando assim equívocos sobre a identificação da espécie e situações decorrentes, como intoxicações. Para esse trabalho escolheu-se *Ocimum gratissimum* L. pelo aspecto popular de seu uso e sobretudo para incrementar informações básicas sobre sua anatomia e histoquímica.

Conhecida popularmente como alfavacão, alfavaca ou alfavaca-cravo, *O. gratissimum* L. é facilmente diferenciada dentro da sua família taxonômica por apresentar um odor característico do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Na literatura, é possível encontrar estudos sobre seu cultivo, colheita, composição química e propriedades farmacológicas e, alguns, sobre estudo anatômico e histoquímico das folhas, porém não priorizam informações sobre a farmacobotânica da espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A Família Lamiaceae (Labiatae)

Lamiaceae (Labiatae) é uma das maiores famílias de Angiospermas. Existem vários estudos que falam sobre a quantidade de gêneros e espécies dessa família, mas, atualmente, o banco de dados do Kew Royal Botanic Gardens possui um registro de 732 gêneros e 7534 espécies dentro essa família. Lorenzi e Matos (2008) apontam que 25 espécies dessa família são plantas medicinais nativas e exóticas no Brasil.

Os tricomas glandulares são estruturas secretoras frequentemente presentes nas Lamiaceae que secretam óleos essenciais, variando o número de células secretoras, o comprimento da célula peduncular, a quantidade do óleo secretado, a densidade e seu arranjo na epiderme (Metcalf e Chalk, 1983). Hay e Waterman (1993) descrevem dois tipos de pelos glandulares nessa família, os peltados e os capitados.

Os estudos de Werker et al. (1985) verificaram que os tricomas peltados e capitados de algumas espécies de Lamiaceae diferem na morfologia, início e duração da atividade secretora, modo de secreção e tipo de material secretado.

2.2. O gênero *Ocimum*

Ocimum apresenta plantas ricas em óleos essenciais largamente usados pelas indústrias para a produção de fármacos, perfumes e cosméticos. Segundo Paton (1999), geograficamente, 30 espécies estão distribuídas pelo mundo, sendo o gênero bem representado nas regiões quentes de ambos os hemisférios, ocorrendo do nível do mar até 1800m de altitude. A África, a Ásia e a América do Sul são os principais centros de diversidade do gênero.

Segundo Hay e Waterman (1993), os tricomas glandulares ocorrem nas duas faces das folhas, sendo que o número de tricomas glandulares por unidade de área, diferentes entre as superfícies adaxial e abaxial e, ainda, entre as porções apical, mediana e basal da folha. Bosabalidis e Tsekos (1984), afirmam que é comum a ocorrência de 4 células constituindo o ápice ou cabeça do tricoma.

2.3. A espécie *Ocimum gratissimum* L.

Figura 1 -Ocimum gratissimum L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas "Profª. Dra. Célia Cebrain Araújo Reis" da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, UNESP, Campus de Araraquara, SP.



Ocimum gratissimum L. é um subarbusto aromático, ereto, com até 1 m de altura, originário do oriente e subespontâneo em todo o Brasil e do qual existem diversos quimiotipos, inclusive o designado como eugenolífero. Folhas ovalado-lanceoladas, de bordos duplamente dentados, membranáceas, de 4-8 cm de comprimento. Flores pequenas, roxo-pálidas, dispostas em racematos paniculados eretos e geralmente em grupos de três. Fruto do tipo cápsula, pequeno, possuindo 4 sementes esféricas. Tem aroma forte e agradável que lembra o cravo-da-índia (Pio-Corrêa, 1984).

Nas práticas usuais da medicina caseira as folhas da alfavaca-cravo são usadas na preparação de banhos antigripais, no tratamento de casos de nervosismo e paralisia (Lorenzi e Matos, 2008); em chás, as folhas são utilizadas como carminativas, sudoríficas e diuréticas, febrífugas, antiblenorrágicas, para tratar tosse, vômitos e tuberculose (Pio-Corrêa, 1984; Rodrigues, 1989). Segundo Matos (1998), o fato de a alfavaca possuir o óleo essencial rico em eugenol lhe confere ação antisséptica local contra alguns fungos e bactérias. Além disso, as folhas, flores e frutos secos ou pulverizados são utilizados como condimentos na culinária.

De acordo com estudos da composição química da planta, o óleo essencial das folhas (3,60%) contém eugenol (77,3%), 1,8-cineol (12,1%), β -cariofileno (2,3%), *cis*-ocimeno (2,1%) o que justifica seu uso na confecção de licores e como sucedâneo do óleo de cravo-da-índia (Mors e Rizzini, 1966; Silva, 1996).

Análises recentes têm verificado a bioatividade do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sobre micro-organismos de elevada patogenicidade, como *Leishmania amazonenses* (Ueda-Nakamura et al., 2006), *Cryptococcus neoformans* (Lemos et al., 2005), *Candida ssp.* (Nakamura, 2004), *Herpetomonas samuelpessoai* (Holetz et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (Nakamura et al., 1999), *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella ssp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgare*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytus* (Gulati e Sinhá, 1990; Ndounga e Ouamba, 1997), além de ação analgésica local em medicação odontológica (Craveiro, 1981). Efeito fungitóxico sobre o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (Júnior et al, 2009).

Apesar da bioatividade, o seu extrato demonstrou toxicidade dose dependente em camundongos com efeitos agudos e evidências histológicas de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (Hernández et al, 2006).

3. OBJETIVOS

Realizar estudo da anatomia e histoquímica da folha de *Ocimum gratissimum* L. e comparar com os dados encontrados na literatura, além de prover dados para controle de qualidade de drogas vegetais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Botânica do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (DPANT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara, Estado de São Paulo.

4.1. Material

Folhas de um exemplar de *Ocimum gratissimum* L., cultivada no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas “Profª. Dra. Célia Cebrian Araujo Reis” do DPANT foram selecionadas para o estudo considerando a total expansão do limbo e seu aspecto saudável, sem manchas visíveis ou partes rompidas.

A exsicata foi enviada para registro em herbário e o processo de tombamento está em andamento.

4.2. Estudo anatômico

Para as análises anatômicas folhas de ramos desenvolvidos conforme item 4.1. foram tomadas ao acaso e sub-amostradas na sua porção mediana. Estas sub-amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (25%) em solução tampão fosfato 0,02M, por imersão, por 24 horas, em temperatura ambiente, sob vácuo.

Após a fixação, o material foi lavado com solução etanólica, desidratado e submetido à inclusão em resina sintética glicol metacrilato, segundo Kraus e Arduin (1997), sendo observadas as recomendações do fabricante (Leica®).

Os blocos contendo o material incluído foram cortados em micrótomo de rotação para obtenção de secções com 7µm de espessura. Após a secagem e aderência em lâminas de vidro, os cortes foram corados com azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 (Kraus e Arduin, 1997). Após a coloração, os cortes foram montados em resina sintética Entellan®. Então, o estudo anatômico foi realizado com o auxílio de um microscópio com captura de imagens (Zeiss® Lab.A1 AxioVision Rel4.8), utilizando luz polarizada para a observação de cristais.

A análise de estômatos deu-se da seguinte forma: os fragmentos foram submetidos a dissociação com HNO₃ (10%) durante 72 horas em estufa a 65°C. Em seguida foram feitas três lavagens sucessivas em água destilada, uma neutralização com NaOH 0,1% e novamente em água destilada (adaptado de Ghouse e Yunus, 1972; Ruzin, 1999). Seguiu-se o clareamento dos fragmentos obtidos em hipoclorito de sódio 2% durante 3 minutos, e 2 lavagens em solução de ácido acético a 0,002%. Em seguida, os fragmentos foram corados com azul de Astra (1%) durante 3 minutos e lavados em etanol 50%. Este material foi transferido para lâminas de contendo solução de glicerina e água (1:1) e recoberto com lamínula.

4.3. Estudo histoquímico

Para o estudo histoquímico foram realizados cortes transversais à mão em folhas frescas, os quais foram submetidos a diferentes testes histoquímicos, examinados em microscópio de captura de imagens (Zeiss® Lab.A1 AxioVision Rel4.8), sendo as imagens armazenadas em arquivos digitais.

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações propostas por Ascensão (2003), tanto para identificação de substâncias apolares como para as polares. Os reagentes utilizados para evidenciar as substâncias apolares constam da Tabela 1.

Para a identificação das lactonas sesquiterpênicas, foi adotado o procedimento descrito por Higuchi (2007), que obteve melhores resultados modificando a proposta de Geissman e Griffin (1971), a qual utiliza solução concentrada de ácido sulfúrico, que em alguns casos não permite a visualização do material de estudo após um período de tempo maior, pois as estruturas celulares se desintegram rapidamente. Higuchi (2007) recomenda a reação com uma solução de ácido sulfúrico concentrado e glicerina a 50% (1:1).

Tabela 1 - Reagentes utilizados para a detecção de compostos apolares, suas funções e suas respectivas referências bibliográficas.

Reagentes apolares	Observa	Referência
Sudan III	Lipídios totais	Juhonsen, 1940
Sulfato azul do Nilo	Diferenciação de lipídios ácidos e neutros	Cain, 1947
Reagente de NADI	Óleos essenciais e oleoresinas	Davi e Carde, 1964
Tricloreto de antimônio	Esteroides	Hardman e Sofowora, 1972; Mace e Howell, 1974
Ácido sulfúrico:gliserina	Lactonas sesquiterpênicas	Geissman e Griffin, 1971
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenóides com grupo carbonila	Ganter e Jollés, 1969 - 1970

Como controle para identificação de substâncias apolares, os cortes foram clarificados com uma solução comercial de hipoclorito de sódio (máximo 2%) e lavado com água destilada. Em seguida, eles foram submetidos por 2 minutos em cada passagem da série etanólica 10%, 30%, 50%, 70% e 100% e cetônica (50% em etanol e 100%), seguida de reidratação gradual. Então os cortes foram lavados novamente com água e submetidos aos reagentes apolares (adaptado de Lewinsohn et al., 1998).

Os reagentes utilizados para evidenciar as substâncias polares constam da Tabela 2.

Tabela 2 - Reagentes utilizados para a detecção de compostos polares, suas funções e suas respectivas referências bibliográficas

Reagentes polares	Observa	Referência
Cloreto férrico	Fenólicos totais	Johansen, 1940
Dicromato de potássio	Fenólicos totais	Gabe, 1968
Vanilina clorídrica	Taninos	Mace e Howell, 1974
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	Svendsen e Verpoorte, 1983
Lugol	Amido	Jensen, 1962
Vermelho de rutênio	Pectinas	Johansen, 1940

Como controle para identificação de substâncias polares, as secções foram tratadas com banho em solução comercial de hipoclorito de sódio (máximo

2%) por 15 minutos, seguido de 3 banhos consecutivos em solução água destilada e ácido acético (1:500).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo anatômico

5.1.1. Anatomia macroscópica

Figura 2 - Vista dorsal e ventral da folha de *Ocimum gratissimum* L.



Com uma altura superior a 2m, a planta de *Ocimum gratissimum* L. apresenta folhas simples, com 15 a 25 cm de comprimento e estão dispostas ao longo do ramo de maneira oposta e cruzada. Possuem uma forma lanceolada com base acunheada, margem dentada e ápice acuminado, como é mostrado na Figura 2. É importante observar que os valores da altura da planta e do tamanho da folha encontrados na literatura são diferentes dos valores da planta que foi objeto desse estudo. Essa diferença pode ser devido à localização e a forma de cultivo das plantas.

5.1.2. Anatomia

O mesofilo é do tipo dorsiventral com epiderme das faces adaxial e abaxial uniestratificada. O parênquima paliçádico é constituído por uma única camada de células (Figura 3B, C e Figura 4E) e, seu parênquima lacunoso,

apresenta pelo menos três camadas (Figura 3C e Figura 4E). Nos cortes transversais, foi possível observar nas duas faces da epiderme a presença de tricomas tectores pluricelulares não ramificados e uniseriados (Figura 3B e 4B), tricomas secretores sésseis ou peltados (Figura 4C e D) e tricomas secretores pedunculados (Figura 4A e D). Nos cortes paradérmicos, observaram-se estômatos diacíticos (Figura 4F). Foi possível observar também, cristais de oxalato de cálcio na forma de pequenas drusas (Figura 3F, G e H).

Estudos anteriores indicam que a folha é anfihipoestomática (Martins, 2006; Martins et al, 2009), porém essa informação não pôde ser confirmada nesse trabalho pois, durante o procedimento de análise dos estômatos, os fragmentos da folha que foram submetidos à técnica utilizada ficaram indistinguíveis e não foi possível diferenciar a face adaxial da face abaxial da epiderme.

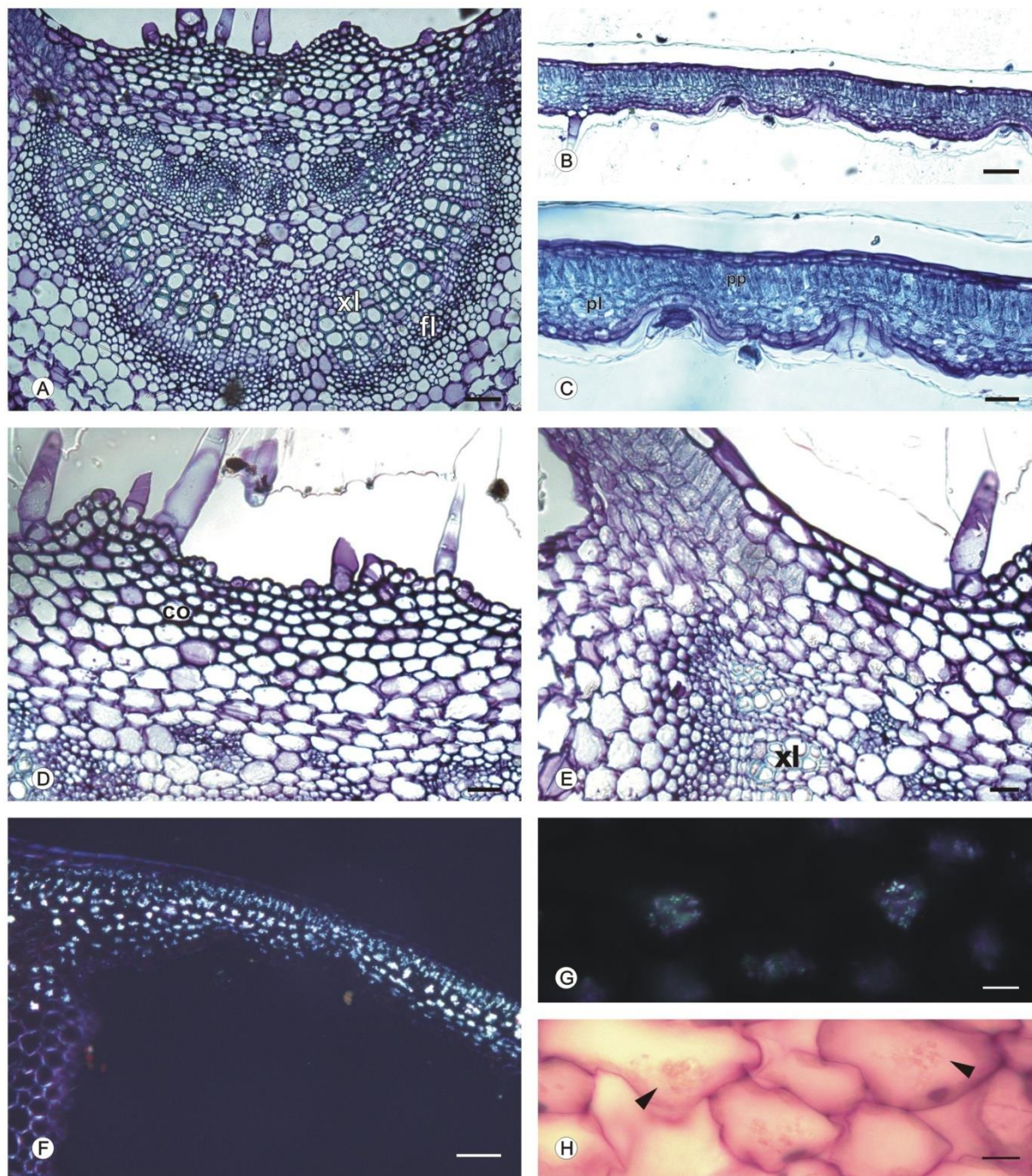


Figura 3 – Fotomicrografias do aspecto anatômico de folhas de *Ocimum gratissimum* L.. A: nervura central com destaque na distribuição do xilema (xl) e do floema (fl); B e C: região do mesófilo, com destaque do parênquima paliádico (pp) e parênquima lacunoso (pl) em C; D: região do colênquima (co) da nervura central; E: nervura central com destaque na região de transição entre o mesófilo e o colênquima; F: distribuição de cristais na região do mesófilo sob luz polarizada; G: detalhe dos cristais sob luz polarizada; H: região do mesófilo contendo cristais (seta). Barras: A, B e F - 100µm; C, D e E - 50µm; G e H - 16µm.

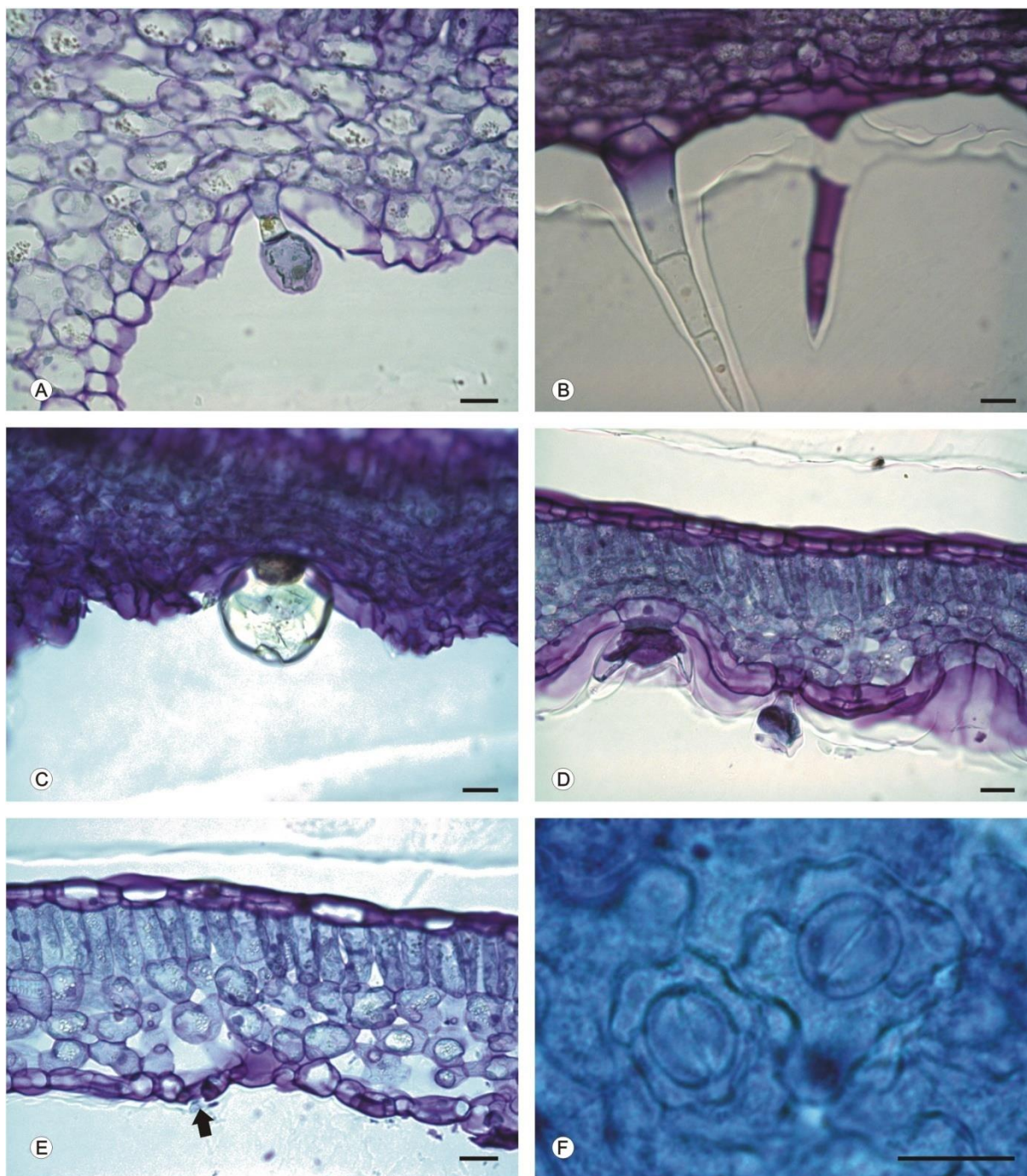


Figura 4 – Fotomicrografias do aspecto anatômico detalhado de folhas de *Ocimum gratissimum* L.. A: tricoma glandular pedunculado; B: tricoma tector pluricelular não ramificado e uni seriado; C: tricoma glandular ou peltado; D: região do mesofilo com destaque para a forma de inserção dos tricomas glandulares peduncular e ; E: destaque do mesofilo com uma fenda estomática (seta); F: estômatos diacíticos em detalhe. Barras: A, B, C, D, E e F - 32µm.

5.2. Estudo histoquímico

Os estudos histoquímicos (Tabela 3) mostraram os seguintes resultados, sendo estes positivos para lipídios totais, lipídios ácidos e neutros, óleos essenciais, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, terpenoides com grupo carbonila, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides.

Tabela 3- Resultados dos estudos histoquímicos dos cortes transversais da folha de *Ocimum gratissimum* L.

Reagente	Observa	<i>Ocimum gratissimum</i> L.
Sudam III	Lipídios totais	+
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos e neutros	+
Reagente de NADI	Óleos essenciais	+
Tricloreto de antimônio	Esteroides	+
Ácido sulfúrico + glicerina	Lactonas sesquiterpênicas	+
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenóides com grupo carbonila	+
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	+
Dicromato de Potássio	Compostos fenólicos	+
Ácido Clorídrico	Flavonoides	+
Vanilina clorídrica	Taninos	-
Dragendorff	Alcaloides	+
Lugol	Amido	-
Vermelho de rutênio	Pectinas	-

No ato da colheita das folhas, notou-se forte e agradável cheiro que lembrava o cheiro do cravo-da-índia. De acordo com os dados encontrados na literatura, podemos dizer que esse cheiro é devido ao óleo essencial presente na folha de *Ocimum gratissimum* L. (Mors e Rizzini, 1966; Pio-Corrêa, 1984; Silva, 1996).

Os resultados positivos para substâncias apolares confirmam a presença de lipídios totais nos tricomas glandulares sésseis (Figura 5B), lipídios ácidos em tricomas glandulares pedunculados e lipídios neutros em tricomas glandulares sésseis (Figura 5D), óleos essenciais nos tricomas glandulares sésseis (Figura 5F), esteroides nos tricomas glandulares pedunculados e sésseis (Figura 5H e I), lactonas sesquiterpênicas na região superficial do colênquima (Figura 5K) e terpenoides com grupo carbonila na epiderme (Figura 5M).

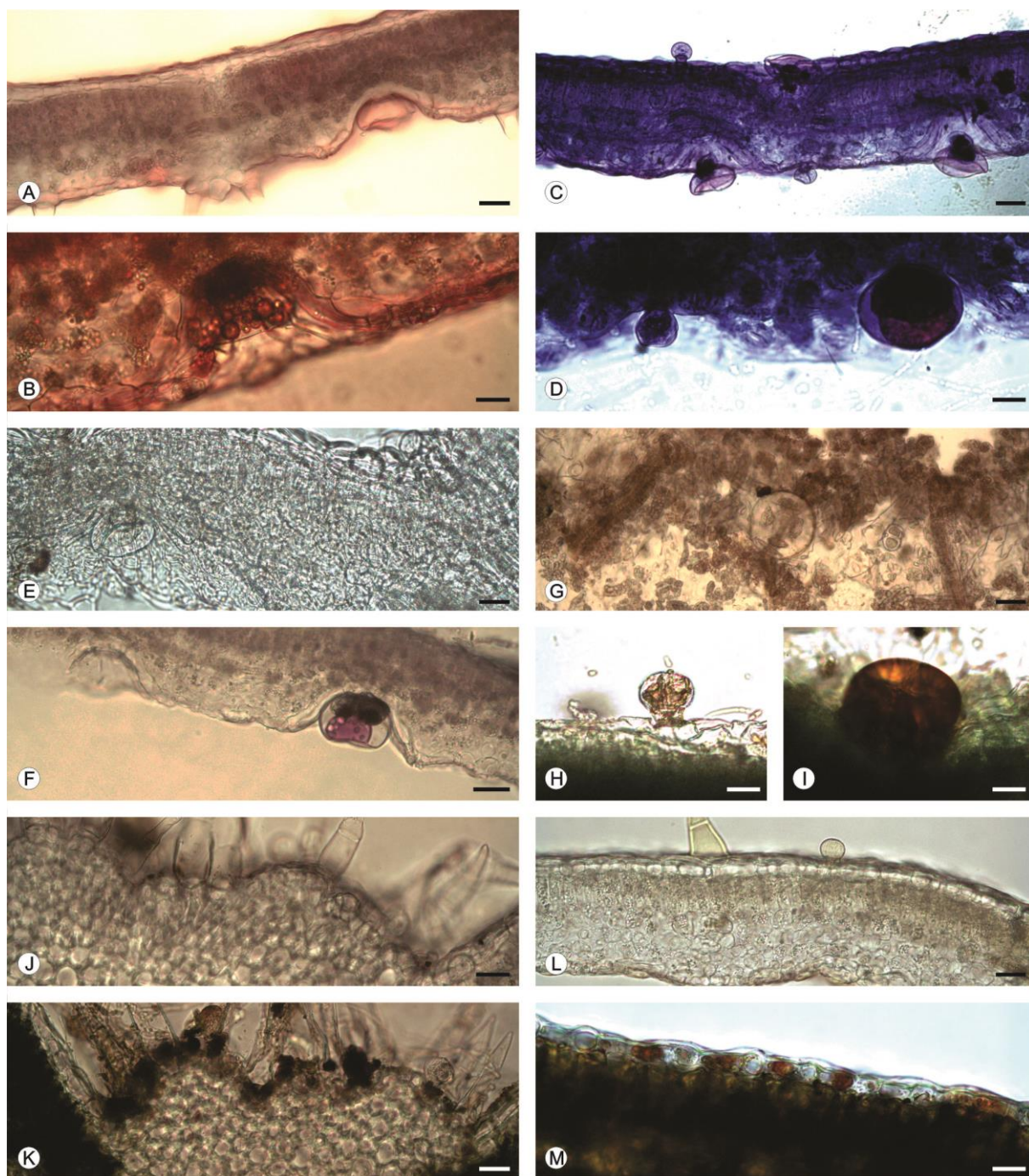


Figura 5 – Fotomicrografia apresentando os resultados histoquímicos positivos para substâncias apolares de *Ocimum gratissimum* L.. A: controle Sudam III; B: resultado positivo para lipídios totais evidenciado no tricoma glandular ; C: controle sulfato azul do Nilo; D: resultado positivo para lipídios ácidos no tricoma glandular pedunculado e para lipídios neutros no tricoma glandular ; E: controle reagente NADl; F: resultado positivo para óleos essenciais no tricoma glandular ; G: controle tricloreto de antimônio; H e I: resultado positivo para esteroides em tricoma glandular pedunculado e tricoma glandular , respectivamente; J: controle ácido sulfúrico + glicerina; H: resultado positivo para lactonas sesquiterpênicas na região superficial do colênquima; L: controle 2,4-dinitrofenilhidrazina; M: resultado positivo para terpenoides com grupo carbonila na face adaxial da epiderme. Barras: A, C, E, F, J, K e L - 50µm; B, D, H, I e M - 32µm.

Os resultados positivos para substâncias polares confirmam a presença de compostos fenólicos (Figura 6B), flavonoides (Figura 6D) e alcaloides (Figura 6H) na região do mesofilo e compostos fenólicos nas epidermes adaxial e abaxial (Figura 6F).

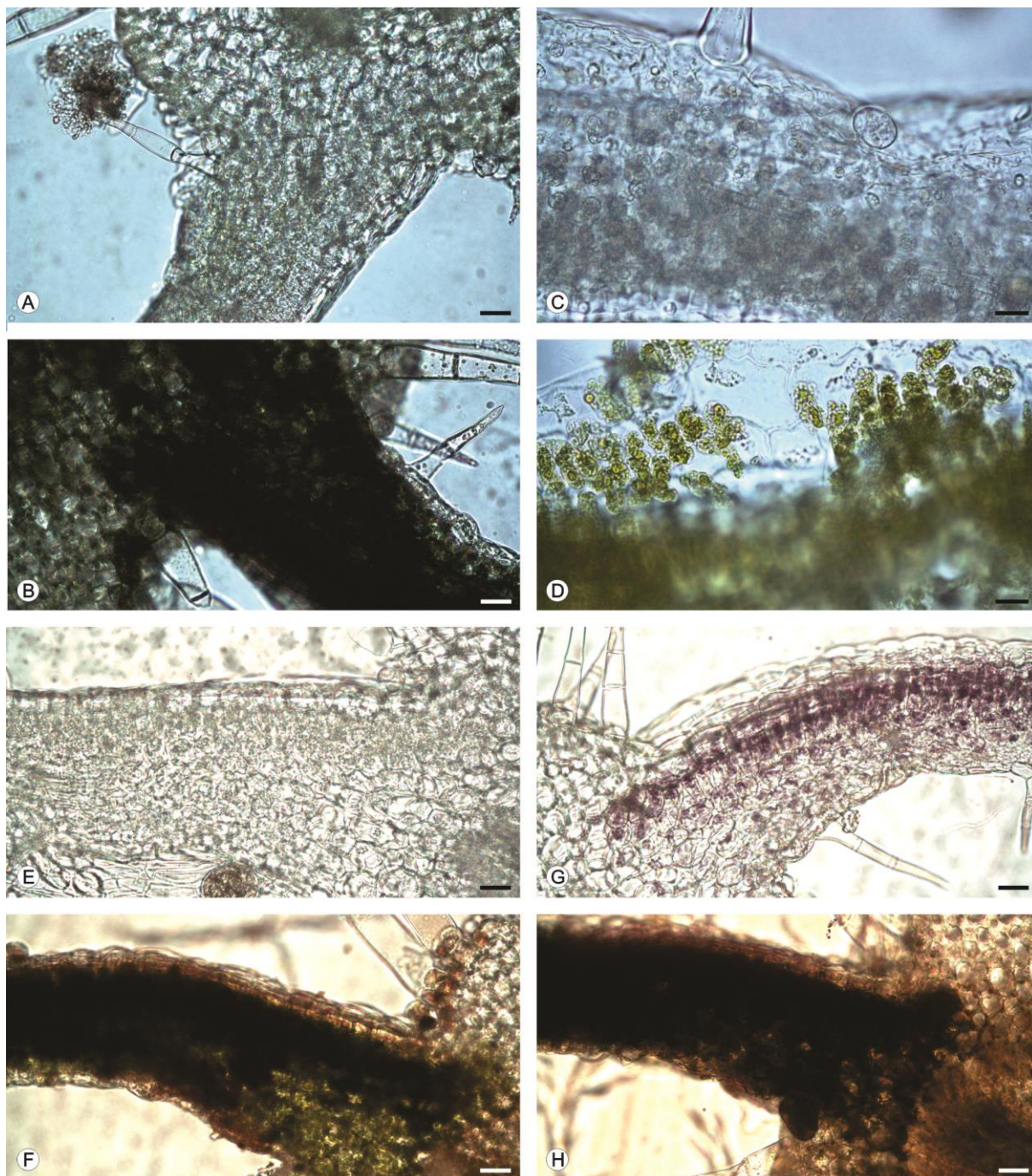


Figura 6 – Fotomicrografia apresentando os resultados histoquímicos positivos para substâncias polares de *Ocimum gratissimum* L.. A: controle cloreto férrico; B: resultado positivo para compostos fenólicos na região do mesofilo; C: controle ácido clorídrico; D: resultado positivo para flavonoides na região do mesofilo; E: controle dicromato de potássio; F: resultado positivo para compostos fenólicos nas faces adaxial e abaxial da epiderme; G: controle Dragendorff; H: resultado positivo para alcaloides na região do mesofilo. Barras: A, B, E, F, F e H - 50µm; C e D - 32µm.

Segundo os estudos fitoquímicos de Matias et al (2010), a folha apresenta taninos flobabênicos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocionidinas, catequinas, alcaloides e terpenos, e também demonstraram atividade contra bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) que atualmente são consideradas resistentes a vários antibióticos, dentre eles, amoxicilina, cefalotina, ciprofloxacina, tetraciclina, neomicina e butirosina. Por ser um estudo mais complexo e por ter utilizado métodos mais sensíveis do que o estudo realizado nesse trabalho, é aceitável que os resultados sejam diferentes para algumas substâncias como, por exemplo, os taninos, em função de diferenças de concentração.

6. CONCLUSÃO

Sobre o estudo anatômico realizado nesse trabalho, pode-se afirmar que a folha da espécie *Ocimum gratissimum* L. apresenta anexos epidérmicos que podem ser usados como referência para sua identificação, como tricomas tectores pluricelulares não ramificados e uni seriados, tricomas secretores peltados e tricomas secretores pedunculados, estômatos diacíticos e presença de cristais em forma de pequenas drusas.

Considerando as observações do estudo histoquímico, pode-se concluir que as folhas de *O. gratissimum* L. podem fornecer diversos compostos que apresentam atividades biológicas importantes e que há indícios que os compostos lipofílicos localizados no interior dos tricomas peltados e pedunculados apresentam características físico-químicas diferentes entre si. Pode-se considerar o conjunto de resultados positivos dos testes histoquímicos uma informação adicional na confirmação da identificação de *O. gratissimum* L..

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

ASCENSÃO, L. Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado. Botucatu: IB-UNESP, 2003.

BOSABALIDIS, A.M; TSEKOS, I.. Glandular hair formation in *Origanum* species. *Annals of Botany*, v.53, p.559-563, 1984.

BRASIL, Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf.

Acessado em: 29 de setembro de 2013.

CRAVEIRO, A. A.. Óleos de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, p. 210, 1981.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5.ed. Volume I. Brasília:Anvisa, 2010. 546p.

GHOUSE, A.K.M. & YUNUS, M.. Some aspects of cambial development in the shoot of *Dalbergia sissoo* Roxb. *Flora (Jena)* 162: 549-558, 1972.

GULATI, B.; SINHÁ, G. K.. Studies on some important species of *Ocimum*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ESSENCIAL OILS, 11., 1989, New Delhi. *Anais...* New Delhi: Aspect Publishing, p. 49, 1990.

HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G.. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Longman Scientific & Technical, p. 185, 1993.

HERNÁNDEZ, N. B.; RUIZ, A. R.; PARRA, A. V.. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L.. Laboratorio Central de Farmacología (LCF) y Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), *REV CUBANA PLANT MED* 2006;11(1).

HIGUCHI, C.T. *Byrsonima* spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. Araraquara, 2007. f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

HOLTZ, F. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; NAKAMURA, C. V.. Effect of essential oil of *Ocimum*

gratissimum on the trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. Acta Protozoologica, Warsaw, v. 42, n. 4, p. 269-276, Nov. 2003.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. v. 1, 198 p.

LE MOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; HASIMOTO e SOUZA, L. K.; LEMOS, A. A.; SILVA, M. R. R.. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, São Paulo, v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.

LEWIN SOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR I.; RAVID U.; PUTIEVSKY E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). Annals Botany, v. 81, p. 35-39, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 320, 2ª edição. 2008.

MARTINS, J. R.. Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.. 2006. 176p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARTINS, J.R. et al . Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. Cienc. Rural, Santa Maria , v. 39, n. 1, Feb. 2009 .

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. Instituto de Biociências, UFRGS. Revista Brasileira de Biociências, 2010.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 219 p.

METCALFE, C. R.; CHALK, L.. Anatomy of the dicotyledons. 2ª ed. Oxford: clarendon Press, vol 2, 1983.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W. de; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of

essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. Research in Microbiology, Amsterdam, v. 155, n. 7, p. 579-586, Sept. 2004.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, São Paulo, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NDOUNGA, M.; OUAMBA, J. M. Antibacterial and antifungal activities of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *O. Basilicum* from Congo. Fitoterapia, Milano, v. 68, p. 190-191, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 178p.

PATON, A.; HARLEY, R. M.; HARLEY, M. M. *Ocimum*: an overview of classification and relationships. In: HOLM, Y.; HILTUNEN, R. (Ed.). *Ocimum*: medicinal and aromatics plants industrial profiles. Series. Amsterdam: Ed. Hardman, 1999. p. 1-38.

PIO-CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 2. Ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 6.

RODRIGUES, R. M. A flora da Amazônia. Belém: CEJUP, 1989.

ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW. Disponível em: <http://www.kew.org>. Acessado em: 15 de outubro de 2013.

RUZIN, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. New York, Oxford University Press.

SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. revisada e ampliada. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007. 1102p.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DIAZ, J.A.; KOREHISA MAZA, P.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. D. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenil-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitology International, Clare, v. 55, n. 2, p. 99-105, June 2006.

WERKER, E.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.. The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Annals of Botany*, London, v.55, p.793-801, 1985.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V.. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, n.1, p.147-52, 2001