

Anatomia foliar com ênfase nos tricomas secretores e análise cromatográfica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae).

Martins, M.B.G.; Pastori, A.P.

UNESP - Câmpus do Litoral Paulista, Unidade São Vicente, Praça Infante Dom Henrique, s/nº-Parque Bitaru. São Vicente (SP), CEP 11330-900.

RESUMO: Folhas adultas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) colhidas durante a época de floração foram utilizadas no estudo da anatomia foliar e na identificação das estruturas secretoras. O material foi fixado em FAA 50 %, desidratado em série alcoólica (etílica), infiltrado em parafina, seccionado, corados e posteriormente analisados através de microscopia óptica. Foi realizado, também, um estudo em cromatografia gasosa para obtenção do óleo essencial bruto. Análises de secções transversais da folha de *Melissa officinalis*, identificaram a presença de dois tipos de tricomas secretores: peltado e capitado, além da presença de tricoma tector. O tricoma capitado, identificado na literatura como (tipo 1), apresenta variações na sua morfologia em relação ao número de células pedunculares e ao número de células secretoras apicais. A análise cromatográfica do óleo essencial identificou a presença de monoterpenos, em dois componentes majoritários, responsáveis por mais de 87,8% da composição relativa no óleo bruto, além de sesquiterpenos em menores proporções.

Palavras-chave: *Melissa officinalis*, tricomas secretores, anatomia foliar, monoterpenos, óleos voláteis

ABSTRACT: Foliar anatomy with emphasis in the secretory trichomes and chromatographic analysis of the essential oil of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). Adult leaves of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) harvested during the time of budding had been used in the study of the leaf anatomy in the identification of the secretory structures. The material was fixed in FAA 50 %, dehydrated in alcoholic series (ethyl), infiltrated in paraffin, sectioned at 13 mm, staining and later analyzed through optic microscopy. Also it was carried through a study in gaseous chromatography for attainment of the crude essential oil. Analyses of transversal sections of the leaf of *Melissa officinalis*, has identified the presence of two types of trichomes secretory: peltate and capitate, beyond the presence of trichome tector. Trichome capitate, identified in literature as (type I), presents variations in its morphology in relation to the cells number stalk and the head secretory cells number. The chromatographic analysis of the essential oil identified the presence of monoterpenes, in two major components, responsible for more than 87.8% of the relative composition in the crude oil, beyond sesquiterpenes in smaller proportions.

Key words: *Melissa officinalis*, secretory trichomes, foliar anatomy, monoterpenes, volatile oils.

INTRODUÇÃO

Muitas espécies de Lamiaceae são aromáticas, e usadas frequentemente na medicina popular como ervas, temperos, e como fonte de fragância. Poucas espécies da família têm sido examinadas anatomicamente, sendo encontrados tricomas glandulares em suas folhas (Werker *et al.*, 1985). Navarro & Qualidid (2000) constataram que os tricomas glandulares constituem uma importante característica taxonômica para Lamiaceae. A classificação morfológica dos tricomas torna possível estabelecer relações sistemáticas com outros

gêneros de Lamiaceae ou famílias relacionadas. Segundo Uphof & Hummel apud Werker *et al.* (1985) e Fahn apud Werker (1985), esses tricomas são responsáveis pela secreção de óleos essenciais. Em seus estudos, Werker (1993) observou que os tricomas glandulares são encontrados sobre as partes vegetativas e reprodutivas das Lamiaceae, sendo que o produto do óleo essencial secretado as protege contra o ataque de herbívoros e patógenos.

Melissa officinalis L., originária de Portugal e Ilha da Madeira, é uma planta perene, herbácea com caules ramificados cuja altura oscila entre 30 e 100 centímetros, apresenta caule quadrangular e folhas pecioladas, opostas, ovais, carenado-serreadas no bordo, nervuras salientes e com cheiro característico (Hertwig, 1986). O chá (infusão) obtido com a

utilização de suas folhas possui propriedades medicinais antiespasmódicas e calmantes (Ladeira, 1983). Segundo Martins *et al.* (1998), *Melissa officinalis* atua ainda como hipotensor.

Óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, formados por misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamados de essências. Possuem sabor geralmente ácido, cor ligeiramente amarelada ou incolor, não são muito estáveis na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, possuem índice de refração e são opticamente ativos. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (Simões & Spitzer, 2000).

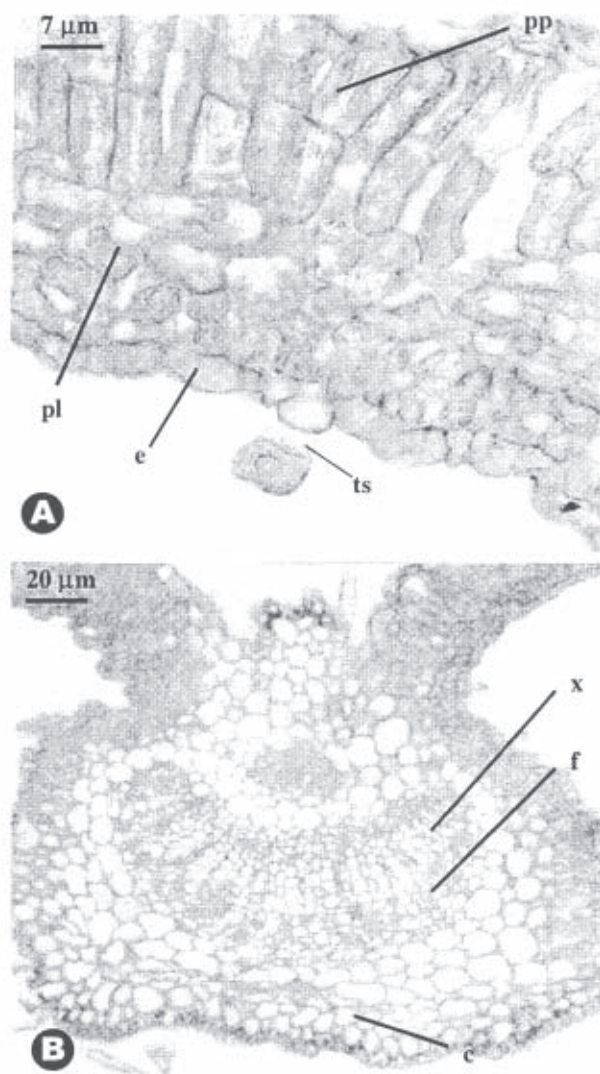
O presente trabalho apresenta um estudo da anatomia foliar através de microscopia óptica em *M. officinalis*, caracterizando histologicamente a lâmina foliar, localizando e descrevendo as estruturas secretoras envolvidas na produção do óleo essencial. Paralelamente, realiza uma análise preliminar do óleo essencial bruto de *M. officinalis* através de Cromatografia Gasosa (CG).

MATERIAL E MÉTODO

1- Estudos de Microscopia Óptica

Os espécimes vegetais estudados foram cultivados na Área Experimental do Departamento de Zoologia e Botânica, IBILCE-UNESP. As populações de *Melissa officinalis* não receberam nenhum tratamento especial no seu cultivo. Com a finalidade de se estudar a histologia da lâmina foliar e realizar a identificação das estruturas secretoras, foram utilizadas folhas adultas, colhidas durante a floração da planta. O preparo do material, para obtenção do laminário histológico usado para o estudo anatômico, constituiu-se basicamente de processos usuais, que incluem: fixação em FAA 50% por 24 horas, desidratação em série alcoólica (etílica), infiltração em parafina, emblocamento, seccionamento, coloração e montagem das amostras (Johansen, 1940). As peças incluídas em parafina, foram seccionadas em micrótomo rotativo, obtendo-se secções transversais da lâmina foliar com 13 μ m.

FIGURA 1 - A: Secção transversal da folha adulta de *Melissa officinalis* L. pp: parênquima paliádico; pl: parênquima lacunoso; e: epiderme abaxial; ts: tricoma secretor. B: Secção transversal da nervura central mediana da folha adulta de *Melissa officinalis* L. x: xilema; f: floema; c: colênquima.



2 - Extração do óleo essencial para análise por Cromatografia Gasosa

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, com condensador tipo *Clevenger* modificado para obtenção dos compostos químicos presentes no óleo essencial bruto do tricoma secretor. A análise do óleo foi realizada através cromatografia gasosa.

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala,

emprega-se o destilador tipo *Clevenger* modificado, acoplado a um balão que contém folhas secas e moídas com água destilada em ebulição. O vapor de água juntamente com o óleo essencial passa pelo condensador tipo *Clevenger*, onde é recolhido. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, então é coletado (Simões & Spitzer, 2000).

O óleo essencial de *Melissa officinalis* foi analisado via Cromatografia Gasosa com detector DIC, no Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica, NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, UNESP.

O equipamento utilizado foi Cromatógrafo Gasoso: CP-3800 Varian, Injetor Automático Autosampler 8200. As condições de análise foram coluna capilar SPB-5 Supelco 30m x 25mm x 10mm. Gás de arraste: He; razão split: 1/20; fluxo 1,0ml/min; detector DIC (detector de ionização de chama), sendo a programação de temperatura utilizada: 60°C a 240°C, 3°C/min; temperatura do injetor de 250°C e do detector 290°C (Adams, 1995).

RESULTADO E DISCUSSÃO

1 - Descrição Anatômica da Lâmina Foliar

Melissa officinalis apresenta o mesofilo dorsiventral formado por duas camadas de células paliádicas alongadas, dispostas perpendicularmente à superfície do limbo e por três a quatro camadas de células de parênquima lacunoso (Figura 1 A).

A nervura de *M. officinalis* apresenta-se delimitada por uma espessa camada de células do colênquima e mais centralmente pela presença de floema e xilema dispostos colateralmente (Figura 1B).

A epiderme foliar possui tricomas secretores distribuídos em ambas superfícies da folha. No presente trabalho, pode-se observar que o tricoma tector é pluricelular constituído por duas células basais e uma célula apical pontiaguda, sendo revestido por cutícula (Figura 2 A), o que está de acordo com o trabalho de Werker *et al.* (1985) onde os tricomas tectores, são unisseriados, freqüentemente multicelulares, variando, dependendo da espécie, em número e comprimento das células e na estrutura da parede. No presente trabalho (Figura 2).

A) foi observado que o tricoma tector é ereto e pontiagudo, o que está de acordo com o trabalho de Ascensão *et al.* (1998) em plantas de *Plectranthus madagascariensis* (Lamiaceae).

Em *M. officinalis*, dois tipos de tricomas secretores foram encontrados:

- Tricoma Peltado: apresenta uma célula basal, uma célula peduncular curta com paredes impregnadas por substâncias lipídicas e um conjunto

de células apicais largas e achatadas formando a cabeça secretora (Figura 2 B). Segundo Werker (1993) os tricomas peltados em Lamiaceae são constituídos por uma célula basal epidérmica, uma célula peduncular curta e geralmente um conjunto de células secretoras superiores formando a cabeça.

- Tricoma Capitado: foram encontrados três tipos de tricomas capitados em *M. officinalis*:

. Tricoma capitado com uma célula basal, uma célula peduncular curta com parede impregnada por substância lipídica e uma única célula formando a cabeça a qual é revestida por cutícula (Figura 2 C).

. Tricoma capitado com uma célula basal, uma célula peduncular curta com parede impregnada por substância lipídica e duas células apicais formando a cabeça, revestida por cutícula (Figura 2 D).

. Tricoma capitado com uma célula basal, duas células pedunculares e duas células apicais formando a cabeça, revestida por cutícula (Figura 2 E).

O tricoma capitado apresenta variações na sua estrutura morfológica, mas são descritos na literatura como pertencentes ao mesmo tipo (tipo I). As variações morfológicas dos tricomas capitados do tipo I, em *M. officinalis* são referentes ao número de células pedunculares e ao número de células secretoras apicais. Todos apresentam apenas uma célula basal (Figura 2C, D, E), uma (Figura 2 C, D) a duas células pedunculares (Figura 2 E) e uma (Figura 2 C) a duas células secretoras apicais (Figura 2 D, E).

Segundo Werker (1993), os tricomas capitados em Lamiaceae são constituídos por uma ou por duas células apicais secretoras sustentadas por um pedúnculo com uma ou mais células, além de uma célula basal, o que está de acordo com o observado em *Melissa officinalis*.

Segundo Werker *et al.* (1985) estudos demonstraram que a secreção é formada no tricoma capitado quando as folhas ainda são jovens. No tricoma peltado a secreção forma-se num estágio mais tardio do desenvolvimento da folha, quando a secreção do tricoma capitado praticamente já cessou.

Em seus estudos Werker *et al.* (1985) observaram dois tipos principais de tricomas, peltado e capitado (tipo I), encontrados em várias espécies de Lamiaceae estudadas, dentre elas *M. officinalis*, o que está de acordo com os poucos registros existentes na literatura (Amelunxen, 1965; Schenpf, 1972; Heinrich, 1973; Economou-Amilli *et al.* apud Werker *et al.*, 1985).

Os tricomas, peltado e capitado, estão presentes em ambas as faces da folha de *M. officinalis*, o que está de acordo com o trabalho de Ascensão *et al.* (1995) observando folhas de *Leonotis leonurus* (Lamiaceae).

FIGURA 2 - A: Tricoma tector, formado por 3 a 4 células revestidas por cutícula, ereto e pontiagudo. B: Tricoma peltado com uma célula basal, uma célula peduncular curta e um conjunto de células apicais largas e achatadas formando a cabeça secretora. C: Tricoma capitado com uma célula basal, uma célula peduncular curta e uma única célula apical formando a cabeça revestida por cutícula. D: Tricoma capitado com uma célula basal, uma célula peduncular curta e duas células apicais formando a cabeça revestida por cutícula. E: Tricoma capitado com uma célula basal, duas células pedunculares e duas células apicais formando a cabeça, sendo revestidas por cutícula. cb: célula basal; cp: célula peduncular; ca: célula apical; c: cutícula.

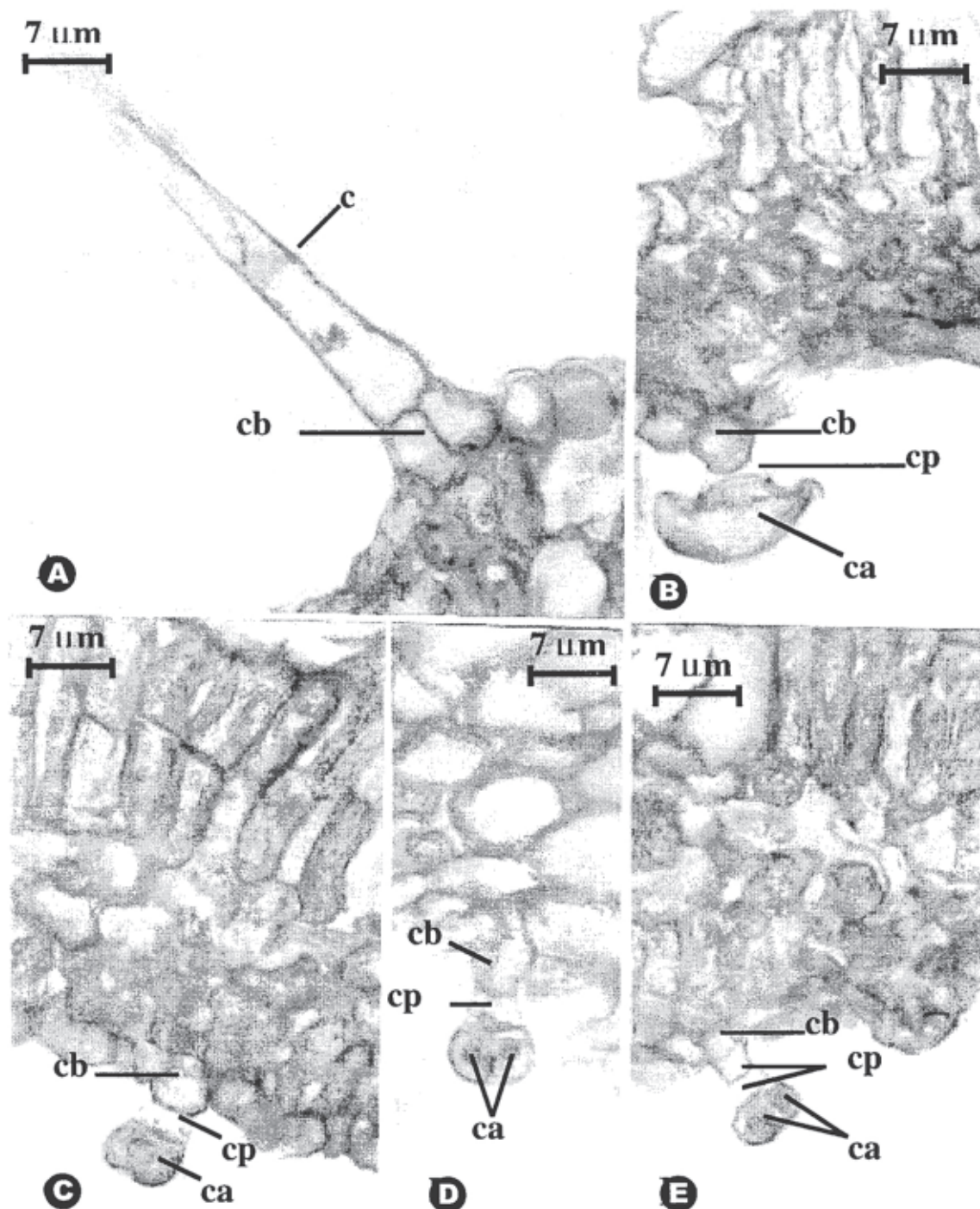
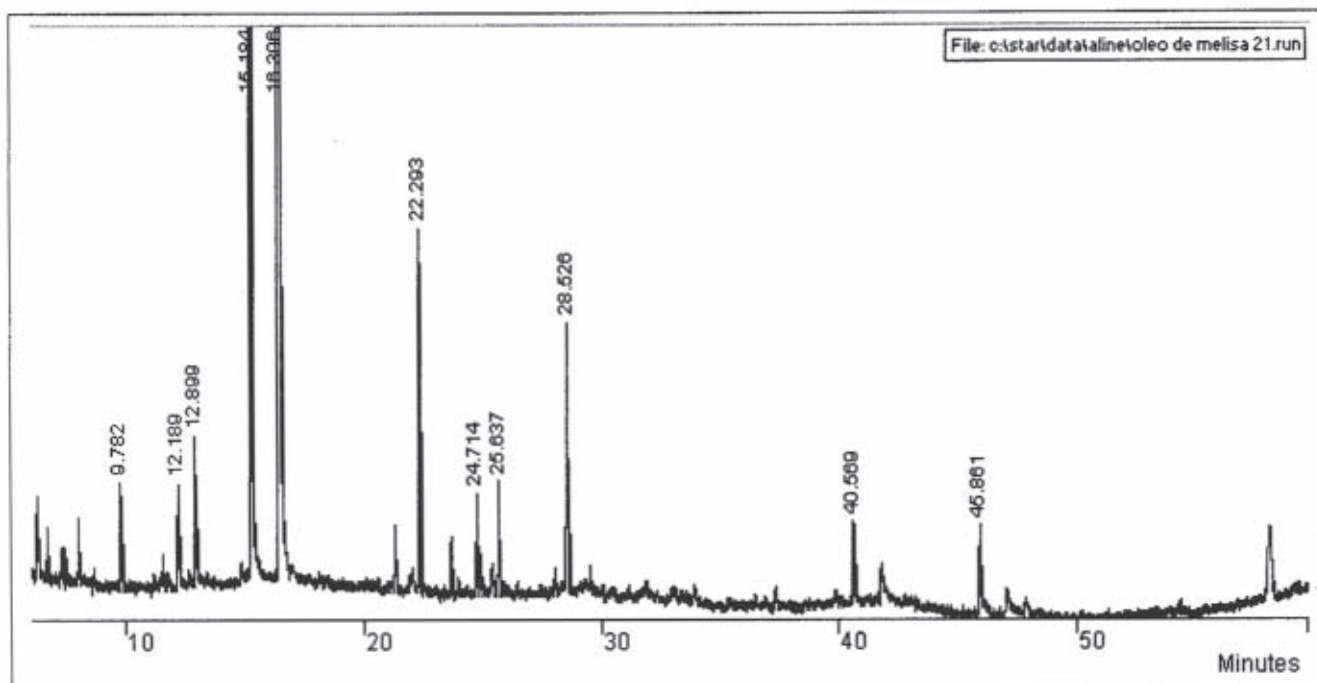


FIGURA 3 - Cromatograma DIC (detector de ionização de chama) do óleo essencial de *Melissa officinalis*



2 - Cromatografia Gasosa

O rendimento do óleo obtido através da extração em *Melissa officinalis* foi de 0,21%. Segundo Sarer *et al.* (1991), o rendimento esperado para *M. officinalis* fica entre 0,06% a 0,375%.

O óleo essencial de *M. officinalis* analisado através de cromatografia gasosa DIC (detector de ionização de chama, onde os compostos da amostra são queimados por uma chama e os íons produzidos são registrados como sinais, ou seja, como picos do cromatograma), mostra que 87,8% do óleo essencial obtido por arraste a vapor é constituído por monoterpenos responsáveis pelo odor característico do óleo essencial, sendo representados por dois componentes majoritários referentes aos picos em 15,19 e 16,30 minutos. Os demais picos observados de 20 a 30 minutos são sesquiterpenos (peso molecular 204) com intensidades relativas menores no óleo essencial obtido (Figura 3).

Segundo Werker *et al.* (1985), foi observado que todos os óleos essenciais de todas as oito espécies analisadas em seu estudo, dentre elas *Melissa officinalis*, os monoterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos) são os componentes majoritários, o que se encaixa com os dados observados experimentalmente, já que esses compostos têm tempo de retenção até aproximadamente 20 minutos nas condições analisadas (Adams, 1995). Os picos observados entre 40 e 50 minutos podem ser picos referentes a sesquiterpenos oxigenados ou a diterpenos (terpenos com 20 carbonos na sua estrutura) segundo Adams (1995).

Em muitas espécies de Lamiaceae, um ou poucos componentes majoritários de seu óleo essencial são responsáveis pela característica do sabor e aroma (Furia & Bellanca apud Werker *et al.*, 1985). Os óleos essenciais de algumas plantas de Lamiaceae produzem e acumulam monoterpenos nos tricomas glandulares anatomicamente especializados (Fahn, 1979; Turner *et al.*, 1999).

Do ponto de vista químico, os óleos essenciais das plantas são constituídos principalmente de uma mistura de lipídeos chamados terpenos (McMurry, 1997). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são monoterpenos, que possuem 10 carbonos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos, que possuem 15 carbonos (Simões & Sptizer, 2000).

Adzet *et al.* (1992), estudando *M. officinalis*, observaram uma porcentagem de 81% citral (neral e geranial) que foi calculado a partir de folhas provenientes de várias regiões. Carnat *et al.* (1998) em seu trabalho observaram que a infusão das folhas de melissa (chá) e a análise do óleo essencial apresentou um rendimento rico em aldeídos com 74% de citral (neral e geranial) e 16% de citronelal. Segundo Lawrence (1979), essas substâncias são responsáveis pelo aroma de limão de *Melissa officinalis*.

AGRADECIMENTO

Ao Doutorando: Marcelo Telascrêa e ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP,

Araraquara, SP, pela utilização do cromatógrafo gasoso.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil by ion trap mass spectroscopy**. San Diego: Academic Press, 1995. p.469.
- ADZET, T., PONZ, R., WOLF, E. *et al.* Content and Composition of *M. officinalis* oil in relation to leaf position and harvest time. **Planta Medica**, v.58, p.562-4, 1992.
- AMELUNXEN, F. Elektronenmikroskopische Untersuchungen na den Drüsenschuppen von *Mentha piperita* L. **Planta Medica**, v.13, p.457-73, 1965.
- ASCENSÃO, L., MARQUES, N., PAIS, M. S. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v. 75, p.619-26, 1995.
- ASCENÇÃO, L., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G. *et al.* *Plectranthus madagascariensis*: Morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. **Internacional Journal of Plant Science**, v.159, n.1, p.31-8. 1998.
- CARNAT, A.P., CARNAT, A., FRAISSE, D. *et al.* The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subspécie officinalis) tea. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 301-5, 1998.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. p.158-222.
- HEINRICH, G. Entwicklung, Feinbau und ölgehalt der drüsenschuppen von *Monarda fistulosa*. **Planta Medica**, v.23, p.154-66. 1973.
- HERTWIG, I.F.V. **Plantas aromáticas e medicinais – plantio, colheita, secagem, comercialização**. São Paulo: Ícone. 1986. p.331- 3.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw -Hill, 1940. p.523.
- LADEIRA, A. M. **Plantas medicinais**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1983. p.21-2. (folheto n.15).
- LAWRENCE, B.M. **Essential oils: 1976-1978**. Wheaton: Allured Publ. Co. 1979. v.1.
- MARTINS, E.H., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C. *et al.* **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. p.114-5.
- McMURRY, J. **Química Orgânica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 1997. p.469-71.
- NAVARRO, T., EL QUALIDID, J. Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic Review. **Anales Jardim Botanic Madrid**, v.57, n.2, p.277-97, 2000.
- SARER, E., KÖKDIL, G. Constituents of the Essential Oil from *Melissa officinalis*. **Planta Medica**, v.57, p.89-90, 1991.
- SCHNEPF, E. Tubulares endoplasmatisches reticulum in Drüsen mit lipophilen Ausscheidung von *Ficus*, *Ledum* un *Salvia*. **Biochemistry Physiology Pflanzenphysiology**, v. 163, p.113-25, 1972.
- SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Editora da UFRGS e UFSC, 2000. p.387-415.
- TURNER, G.W., GERSHENZON, J., NIELSON, E.E. *et al.* Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. **Plant Physiology**, v.120, p.879-86, 1999.
- WERKER, E., RAVID, U., PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. **Israel Journal of Botany**, v.34, p.31-45, 1985.
- WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae - a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.8, p.249-55, 1993.