

## Estrutura da folha de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) como subsídio para o controle de qualidade

Zaniolo, S.R.<sup>1</sup>; Boeger, M.R.<sup>2</sup>; Negrelle, R.R.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Produção Vegetal, UFPR; <sup>2</sup>Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia, UFPR, Curitiba-PR, C.P 19031, CEP 81.523.990.

**RESUMO:** A utilização de plantas medicinais tem um problema potencial que é a mistura de outras plantas que podem ser adicionadas junto a espécie de interesse, alterando seu valor medicinal. Alguns aspectos estruturais da folha de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae), foram descritos para auxiliar no controle de qualidade da espécie que apresenta propriedades medicinais comprovadas. A coleta do material vegetal foi realizada na Reserva Volta Velha, localizada em Itapoá, estado de Santa Catarina. As análises anatômicas foram realizadas em folhas adultas, sendo que a lâmina foi analisada na região mediana, ao nível da nervura central e o pecíolo foi descrito na porção central. Estômatos laterocíticos e grandes, mesófilo com parênquima paliçádico e lacunoso pouco diferenciados, presença de células epidérmicas secretoras, esclereídes, hidatódios e ductos no pecíolo constituem características próprias da espécie e podem ser usadas para testar possíveis misturas de outros produtos.

**Palavras-Chave:** *Hedyosmum*, plantas medicinais, controle de qualidade, anatomia foliar.

**ABSTRACT:** Quality control of *Hedyosmum brasiliense* Mat. ex Miq. (Chloranthaceae) through its leaf structure. The utilization of medicinal plants presents the potential problem of other matter being used as filler material, thereby reducing the true medicinal value. The leaf structure of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) was studied in this work, as an aid toward quality control of this medicinal species. Plant material was collected from the Volta Velha Reserve, located in Itapoá, state of Santa Catarina, BR. Anatomical analyses were made of mature leaves. Lamina were analyzed at the leaf center, at the level of its midrib. Petiole were analyzed at the half length. Laterocytic and large stomata, presence of glandular epidermal cells, undifferentiated mesophyll, sclereids, hydathodes in the lamina, and ducts in the petiole are characteristics typical of this species, and are useful in testing the possible admixture of other products.

**Key words:** *Hedyosmum*, medicinal plants, quality control, leaf anatomy.

### INTRODUÇÃO

Entre as espécies da Floresta Atlântica, *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq., é conhecida na medicina popular como cidrão, cidreira entre outras denominações regionais (Correa, 1926; Reitz, 1965; Gabriel, 1991). As folhas e raízes apresentam propriedades analgésicas e antimicrobianas comprovadas (Guedes, 1997). A espécie pertence a família Chloranthaceae, ocorrendo espontaneamente na Bolívia e Brasil, especialmente em Minas Gerais, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Ochioni, 1954; Reitz, 1965; Hatschbach & Koczicki, 1973). Seu *habitat* caracteriza-se quase exclusivamente como margens de rios, riachos, cachoeiras ou barrancos onde a água está presente (Ochioni, 1954).

Considerando-se que as informações sobre a anatomia foliar desta espécie são escassas, limitando-se a descrição da superfície foliar em Metcalfe (1987), o presente trabalho teve como objetivo caracterizar alguns aspectos estruturais da folha, órgão geralmente comercializado na forma de frag-

mentos, de maneira a subsidiar o controle de qualidade do comércio e industrialização desta espécie, evitando possível adulteração. Além disso, vem a contribuir para o conhecimento de uma espécie constituinte na Mata Atlântica, ecossistema amplamente ameaçado devido à exploração insustentada de seus recursos.

### MATERIAL E MÉTODO

A coleta do material vegetal de *Hedyosmum brasiliensis* Mart. ex Miq. foi realizada na Reserva Volta Velha, Município de Itapoá, SC (26°04'S, 48°38' W Gr), localizada na planície quaternária litorânea e abrangendo remanescente de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (Klein, 1978; Leite & Klein, 1990). Esta região está classificada climaticamente como AB'3ra', de acordo com Thornthwaite (1948) citado por Negrelle (1995). As exsicatas do material identificado, por Raquel R. B. Negrelle, encontram-se depositadas no Herbário do

Recebido para publicação em 23/10/00 e aceito para publicação em 05/10/01.

As folhas adultas, expostas ao sol foram obtidas a partir do quarto nó, a contar do ápice em direção à base. Para análise da anatomia foliar utilizaram-se secções transversais medianas do limbo que foram fixadas em FAA 50% (Johansen, 1940), desidratadas em série etanólica e embocadas em glicol metacrilato (GMA), segundo técnica de Feder & O'Brien (1968). Os blocos foram seccionados, em micrótomo rotatório, com 8  $\mu\text{m}$  de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina 0.5% em solução aquosa (O'Brien, Feder & McCully, 1965) e montadas em Entelan. Para a observação do pecíolo foram realizados cortes transversais à mão livre na região mediana, que foram corados com safranina 0.5% em solução aquosa e montados com glicerina a 30% (Berlyn & Miksche, 1976).

Para evidenciar a epiderme, esclerídes e hidatódios, utilizou-se uma solução de água oxigenada 30 volumes e ácido acético glacial (1:1) a 60°C, onde os fragmentos de folhas permaneceram durante quatro dias (Franklin, 1945 citado por Kraus & Ardwin, 1997). Posteriormente, a epiderme foi separada e as amostras foram coradas com safranina a 0.5% em solução de etanol/xileno (1:1) e montadas em Entelan.

A determinação do número de estômatos/ $\text{mm}^2$ , na região do terço médio, foi realizada pela projeção de imagem em câmara clara, empregando-se objetiva de 10X. A imagem de 1  $\text{mm}^2$  de superfície foliar foi projetada sobre um quadrado de 10,6cm de lado, onde os estômatos foram marcados, contados e posteriormente, calculou-se a média aritmética de 24 campos. Para determinar o comprimento médio da célula-guarda foram mensurados cinco estômatos na região do terço médio de 12 folhas de 12 indivíduos.

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio óptico e estereoscópico ZEISS, com câmara fotográfica acoplada. A análise em Microscópio Eletrônico de Varredura, para a observação da epiderme, foi realizada a partir de material fixado em FAA 50% com posterior desidratação em série etanólica e emprego do ponto crítico em equipamento Balzers CPC-010. As amostras foram montadas em suporte metálico e revestidas com ouro em equipamento Balzers Sputtering SC-030. As eletromicrografias foram efetuadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Philips 505.

A região do pecíolo foi observada em microscópio óptico com auxílio de câmara clara e representada na forma de diagrama de acordo com as convenções de Metcalfe & Chalk (1979). Na classificação do tipo de estômato adotou-se a terminologia de Hartog & Baas (1978).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

As folhas de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. apresentam cutícula delgada (Figuras 3 e 4) e esta característica é comumente citada para plantas de ambiente úmido (Napp-Zinn, 1984). No entanto, Swamy (1953) encontrou para o gênero a presença de cutícula espessa em torno da abertura estomatal, o que se constitui em uma característica que varia muito em função do ambiente onde a planta se encontra. A epiderme, em secção transversal, é uniestratificada, sendo a face adaxial formada por células maiores e mais altas que as da face abaxial (Figura 11). Em vista frontal, as duas faces apresentam as paredes com contorno reto a levemente sinuoso. Em ambas as faces, ao mesmo nível das demais células epidérmicas, ocorrem células secretoras que destacam-se por apresentarem coloração mais intensa pelo azul de toluidina e por estarem circundadas radialmente pelas células epidérmicas adjacentes (Figuras 1 e 2). Também, Swamy (1953) e Takhtajan (1997) citam para a família Chloranthaceae a presença de células secretoras dispersas no mesofilo.

As folhas são hipostomáticas, com estômatos laterocíticos circundados por cinco, seis ou até sete células subsidiárias situadas no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 6) Metcalfe & Chalk (1950) não se referem aos estômatos desta família como a um tipo estabelecido, mas, como a um "tipo especial". Swamy (1953) encontrou para o gênero estômatos circundados por um número variável de células subsidiárias (4-6) formando uma roseta. Baranova (1983) cita para *Hedyosmum* a presença de estômato laterocítico, que segundo Hartog & Baas (1978) é definido como: estômato flanqueado por três ou mais células subsidiárias todas ao redor das laterais do par de células-guarda; paredes anticlinais separando as células subsidiárias adjacentes que circundam o par de células-guarda. As características do estômato apresentadas para essa espécie em Metcalfe (1987), tais como: células-guarda distintas quanto a largura e a presença de barras nas regiões polares não foram evidenciadas neste trabalho. As folhas apresentaram uma densidade média de 433,8 estômatos/ $\text{mm}^2$  (desvio padrão  $\pm 8.74$ ) e comprimento médio da célula guarda de 44,23  $\mu\text{m}$  (desvio padrão  $\pm 2.68$ ). Howard (1969) verificou para *Hedyosmum arborescens* estômatos maiores que 46  $\mu\text{m}$  de comprimento, enquanto que para uma outra condição ambiental - floresta tropical alto montana - Tanner & Kapos (1982) verificaram para *H. arborescens* o comprimento médio da célula-guarda de 26,7  $\mu\text{m}$  e uma densidade de 665 estômatos/ $\text{mm}^2$

Segundo Wilkinson (1979) somente para poucas famílias foram verificados estômatos de 40µm ou maiores e muitos autores concordam que o tamanho do estômato é uma característica diagnóstica estável, desde que, uma completa variação de tamanho seja dada.

O mesofilo apresenta parênquima paliçádico e lacunoso pouco diferenciados. Na porção do mesofilo voltada para a face adaxial ocorrem de 3 a 4 camadas de células ligeiramente alongadas, com muitos cloroplastos. Na porção oposta ocorrem 7 a 9 camadas de células de forma irregular, com número menor de cloroplastos e com espaços intercelulares amplos (Figura 11). Como verificado por Solereder (1899), Thierry (1912) e outros citados por Swamy (1953) e Metcalfe (1987) a família Chloranthaceae não apresenta tecido paliçádico típico. Segundo Esau (1976) numerosas dicotiledôneas herbáceas possuem folhas com mesofilo relativamente indiferenciado, o que somado a outras características como folha frequentemente fina, cutícula delgada e estômatos mais ou menos elevados se manifestam em folhas hidromorfos. No mesofilo, ainda ocorrem muitos esclereídes irregulares e ramificados (Figura 5). Também, em Mauseth (1988, p.239) é apresentada uma fotomicrografia de *H. arborescens* onde são evidenciados esclereídes que apresentam a mesma morfologia encontrada para *H. brasiliense*. Ainda, Swamy (1953) e Metcalfe (1987) confirmam a presença de esclereídes isolados ou agrupados na epiderme e mesofilo para o gênero *Hedyosmum*. Para Mauseth (1988) os esclereídes representam uma proteção contra herbivoria ou possivelmente poderiam atuar como reservatórios de água. Nos hidatódios presentes nas margens das folhas não foram evidenciados poros, entretanto, observaram-se traqueídes e esclereídes (Figura 7). Os hidatódios podem apresentar poros de tamanho muito reduzido ou estes podem estar obstruídos (Wilkinson, 1979).

Na nervura central da região mediana do limbo, o sistema vascular é constituído por um feixe colateral central circundado por parênquima fundamental e por outro feixe de menor porte localizado lateralmente ao feixe central. Abaixo da epiderme, em ambas as faces, encontram-se três camadas de colênquima (Figura 10). Os feixes vasculares de menor porte são do tipo colateral, encontram-se dispersos no mesofilo e possuem bainha parenquimática desprovida de extensões (Figura 9).

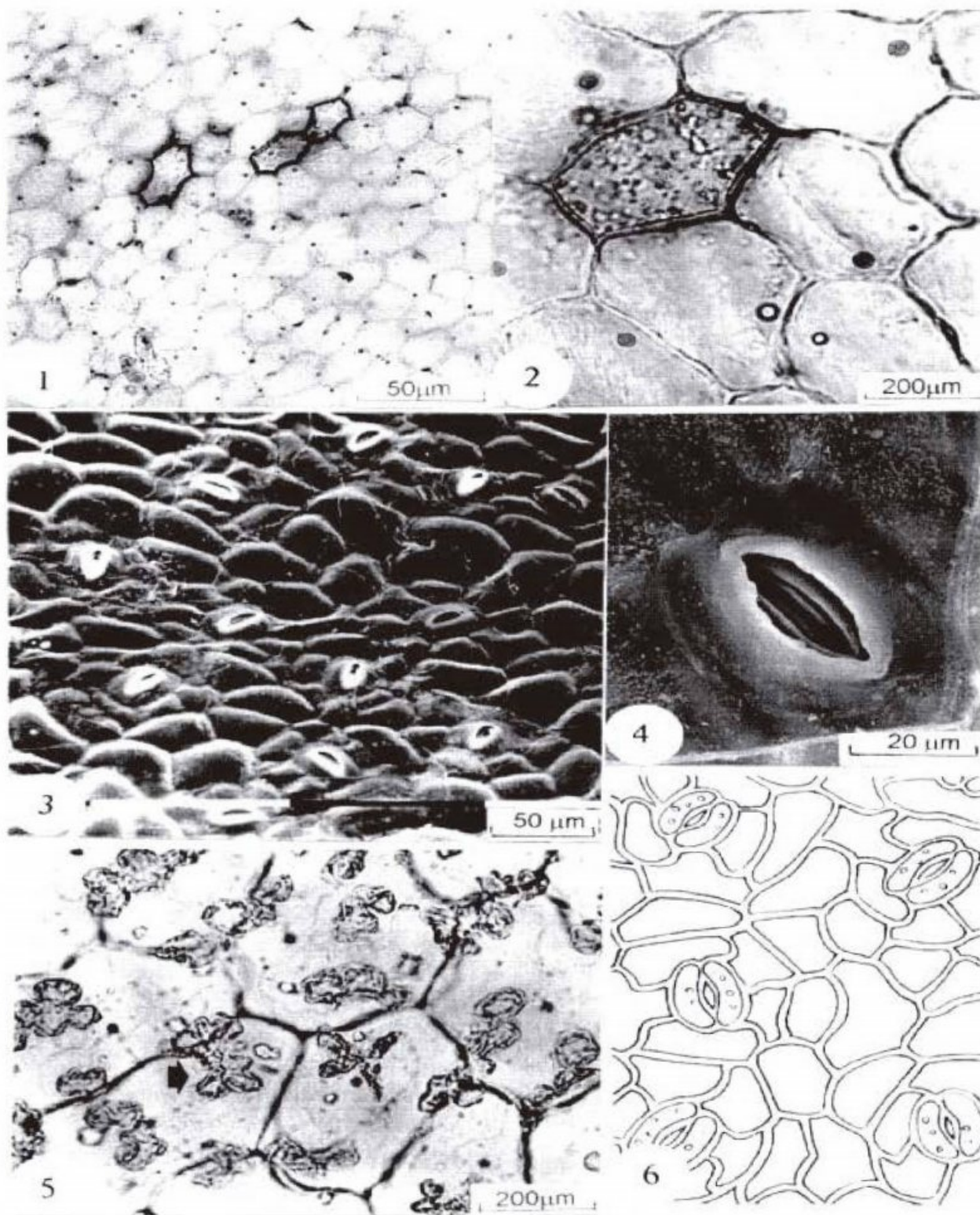
O pecíolo, em secção transversal, apresenta epiderme uniestratificada, seguida por 6 camadas de colênquima. O sistema vascular caracteriza-se por possuir cinco feixes vasculares mais ou menos agregados, sendo que os menores apresentam uma posição mediana com um par de cordões mais largos em ambos os lados. Acima dos feixes, encontram-se dutos (Figura 8). Dutos de mucilagem também foram encontrados em *H. arborescens* (Skutch, 1927; Swamy, 1953).

Sobre a nervura central da face abaxial foram observadas domácias que se apresentam na forma de bolsas de tamanho variado onde frequentemente alojam-se ácaros (Figura 12). As domácias são predominantemente encontradas em plantas lenhosas de regiões tropicais úmidas e sub-tropicais (Metcalfe & Chalk, 1979). Estudos recentes têm demonstrado que as domácias estão associadas principalmente com predadores e ácaros frugívoros, com um benefício potencial para as plantas hospedeiras (Pemberton & Turner, 1989; Walter & O'Dowd, 1992).

Os resultados obtidos revelaram algumas características anatômicas que podem ser utilizadas para uma melhor identificação de *Hedyosmum brasiliensis* e que servem como um instrumento útil para evitar a adulteração de material vegetal utilizado na fitoterapia, sendo estas: estômatos laterocíticos e grandes, tamanho médio próximo à 44 µm; células secretoras na epiderme; mesofilo com parênquima paliçádico e lacunoso pouco diferenciados; abundância de esclereídes no mesofilo; presença de hidatódios e dutos no pecíolo.

## AGRADECIMENTO

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pela utilização do MEV e revelação das fotomicrografias. Aos laboratórios de Botânica Estrutural e Microtécnica do Departamento de Botânica da UFPR. Ao biólogo Nilson Beiém Filho, pelos auxílios na microtécnica. À família Machado, proprietários da Reserva Volta Velha, pela permissão para coleta do material botânico. À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.



**FIGURA 1** - Vista frontal da face adaxial da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

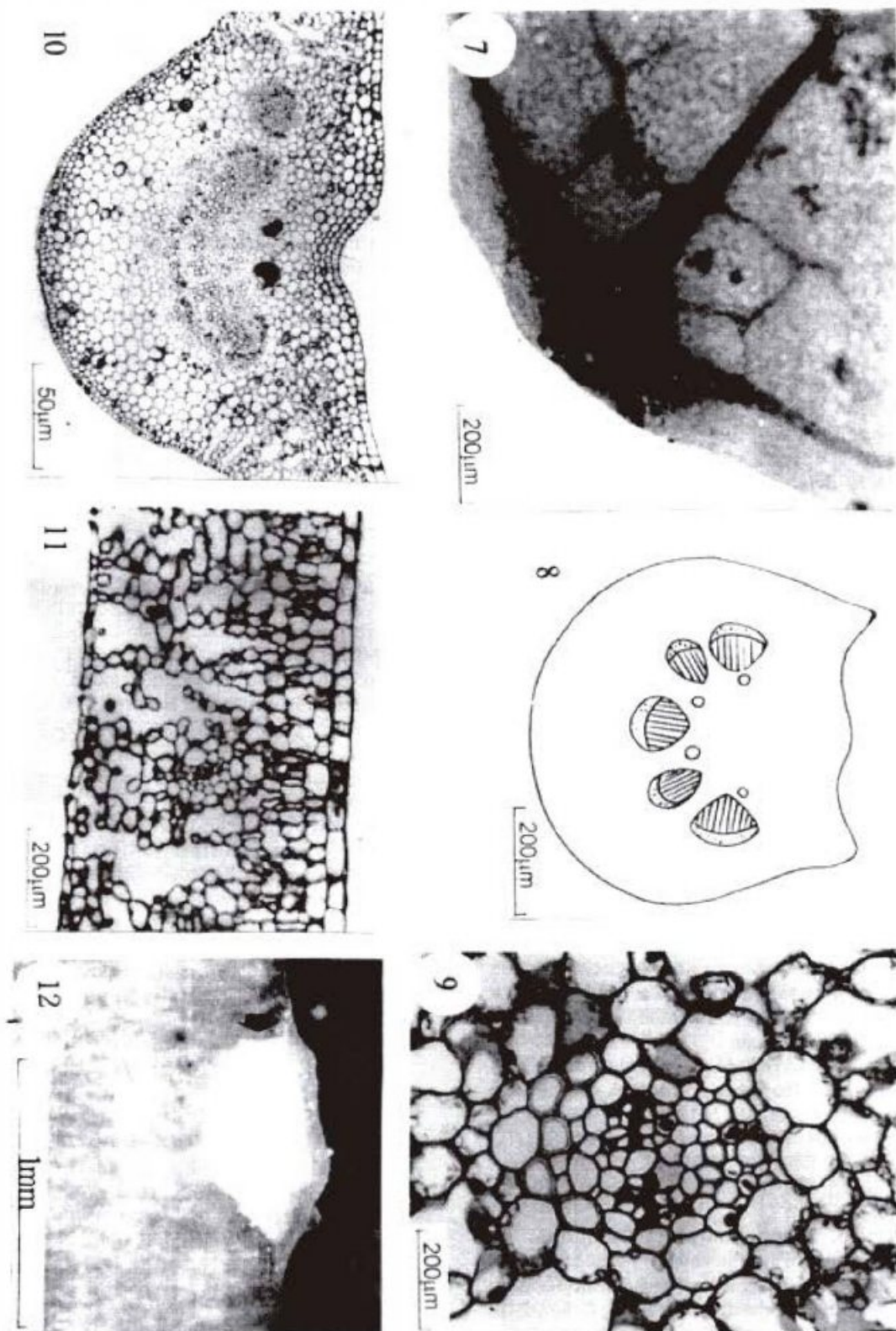
**FIGURA 2** - Detalhe da face adaxial da folha de *Hedyosmum brasiliense*, em vista frontal, evidenciando as células secretoras da epiderme.

**FIGURA 3** - Vista frontal da face abaxial da epiderme da folha de *Hedyosmum brasiliense*; MEV

**FIGURA 4** - Detalhe do estômato, em vista frontal da face abaxial da epiderme da folha de *Hedyosmum brasiliense*; MEV

**FIGURA 5** - Detalhe dos esclereídes da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

**FIGURA 6** - Desenho esquemático da face abaxial da epiderme da folha de *Hedyosmum brasiliense*, evidenciando estômatos.



**FIGURA 7** - Vista frontal dos hidatódios da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

**FIGURA 8** - Desenho esquemático da secção transversal do pecíolo de *Hedyosmum brasiliense* evidenciando a distribuição dos feixes vasculares e dutos.

**FIGURA 9** - Detalhe, em secção transversal, do feixe condutor de menor porte da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

**FIGURA 10** - Secção transversal da região da nervura central da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

**FIGURA 11** - Secção transversal do mesófilo de *Hedyosmum brasiliense*.

**FIGURA 12** - Detalhe da domácia sobre a nervura central da face abaxial da folha de *Hedyosmum brasiliense*.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BARANOVA, M. On the laterocytic stomatotype in angiosperms. *Brittonia*, v.35, n.1, p.93-102, 1983.
- BERLYN, G.P., MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: The Iowa State Press, 1976. 326p.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v.2, 209p.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 293p.
- GABRIEL, M. M. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Chloranthaceae**. Curitiba, 1991. 132p. Dissertação (Mestrado-Botânica) - Universidade Federal do Paraná.
- GUEDES, A. **Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae)**. Florianópolis, 1997. 127p. Dissertação (Mestrado - Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- FEDER, N. , O' BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principals and new methods. *American Journal of Botany*, v.55, n.1, p.123-142, 1968.
- HARTOG, R.M. den , BAAS, P. Epidermal characters of the Celastraceae sensu lato. *Acta Botanica Neerlandica*, v.27, p.355-388, 1978.
- HATSCHBACH, G., KOCZICKI, C. Clorantáceas do Estado do Paraná. **Boletim do Museu Botânico do Paraná**, v.7, p. 1-5, 1973.
- HOWARD, R. A. The ecology of na elfin forest in Puerto Rico. Studies of stem growth and form and of leaf structure. *Journal of the Arnold Arboretum*, v.50, p. 225-267, 1969.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523p.
- KLEIN, R.M. **Contribuição ao conhecimento da flora e vegetação do Vale do Itajaí - Santa Catarina**. 1978. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de São Paulo.
- KRAUS, J.E., ARDWIN, M. **Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal**. São Paulo: Universidade Rural, 1997. 198p.
- LEITE, P.F., KLEIN, R.M. Vegetação. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Geografia do Brasil: região sul**. Rio de Janeiro, 1990. v.2.
- MAUSETH, J. **Plant Anatomy**. California: The Benjamin/Cummings Publishing, 1988. 560p.
- METCALFE, C.R. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford : Clarendon Press, 1987. v.3, 224p.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford : Clarendon Press, 1950. v.2, 1500p.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1979. v.1, 276p.
- NAPP-ZINN, K. Anatomie des blattes. Blattanatomie der angiospermen. In: LISBAUER, K. **Handbuch der Pflanzenanatomie**. Berlin : Gebruder Borntraeger, 1984. v.2.
- NEGRELLE, R.R.B. **Composição florística, estrutura fitossociológica e dinâmica de regeneração da floresta atlântica na reserva Volta Velha, mun. Itapoá, SC**. São Carlos, 1995. 222p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. , McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, v.59, p.368-373, 1965.
- OCCHIONI, P. **Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw**. Rio de Janeiro, 1954. 176p. Tese (Professor Catedrático) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Brasil.
- PEMBERTON, R.W. , TURNER, C.E. Occurrence of predatory and fungivorous mites in leaf domatia. *American Journal of Botany*, v.76, n.1, p.105-112, 1989.
- REITZ, P.R. Chloranthaceae. In: \_\_\_\_\_. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1965. 10p.
- SKUTCH, A .F. Peculiarities in the structure of the stem, related to the leaf sheath in *Hedyosmum*. *Annals of Botany*, v.41, p. 715-30, 1927.
- SWAMY, B.G.L. The morfology and relationships of the Chloranthaceae. *Journal of the Arnold Arboretum*, v.34, p.375-411, 1953.
- TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1997. 643p.
- TANNER, E.V.J. , KAPOV, V. Leaf structure of jamaican montane rain-forest trees. *Biotropica*, v.14, n.1, p.16-24, 1982.
- WALTER, D.E. , O'DOWD, D.J. Leaves with domatia have more mites. *Ecology*, v.73, p.1514-18, 1992.
- WILKINSON, H.P. The plant surface (mainly leaf). In: METCALFE, C.R. , CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1979. v. 1., p.97-165.