

FUNDAÇÃO DO ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE - FESURV
UNIVERSIDADE DE RIO VERDE - UniRV
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA E BACHARELADO

ANATOMIA FOLIAR E HISTOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Aristolochia cymbifera*

MARIANE BORGES DORNELES

ORIENTADOR: PROF. Ms. HENRIQUE ANTONIO DE OLIVEIRA LOURENÇO

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Biologia e Química da Universidade Rio Verde - UniRV, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

RIO VERDE – GO
2013

ANATOMIA FOLIAR E HISTOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Aristolochia cymbifera*

Mariane Borges Dorneles¹

Henrique Antônio de Oliveira Lourenço²

RESUMO

Diversas espécies brasileiras apresentam potencial fitoterápico, entretanto necessitam de mais estudos para uma melhor utilização, especialmente no que se refere à anatomia e histoquímica, considerados estudos preliminares para pesquisas mais detalhadas. Visando conhecer melhor internamente os tecidos foliares de *Aristolochia cymbifera* e a existência de estruturas de armazenamento de compostos, amostras de suas folhas foram caracterizadas anatomicamente e histoquimicamente. A morfologia da folha de *A. cymbifera* apresentou padrões anatômicos semelhantes aos encontrados em *Aristolochia birostris* e *Aristolochia papilares*, indicando similaridade com os padrões descritos, para espécies da família Acanthaceae. Foi possível verificar presença de estruturas de armazenamento de algum tipo de composto na epiderme adaxial e no mesofilo foliar entre os parênquimas paliçádico e lacunoso.

Palavras-chave: morfologia interna, folhas, estruturas, caracterização, jarriinha.

¹Acadêmica do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde –UniRV.

²Professor Mestre substituto da Universidade de Rio Verde – UniRv do Curso Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado.

INTRODUÇÃO

Devido ao aumento do interesse por produtos naturais, o uso de plantas medicinais tornou-se amplo, entretanto muitas destas plantas não têm sido estudadas e devem ser melhor avaliadas quanto à atividade fitoterápica (DUARTE et al., 2006). O estudo de algumas espécies vem ganhando muita importância, pois, além de esclarecer diferentes aspectos relativos aos casos de intoxicações e efeitos maléficos, permite investigar constituintes químicos capazes de exercer a ação tóxica, podendo ainda identificar substâncias ativas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e inseticidas (VIEIRA et al., 2002). Estudos mostram que entre cerca de 200.000 espécies vegetais presentes no Brasil, pelo menos 50% pode ter alguma propriedade terapêutica, na prevenção ou cura de alguma enfermidade. Diversas pesquisas científicas comprovam e podem confirmar as propriedades medicinais de várias espécies utilizadas popularmente (CARIBÉ e CAMPOS, 1991).

Cerca de 400 espécies compõem o gênero *Aristolochia* (CHAN et al., 1999). Destas, mais de 60 espécies ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil, até a Bahia, sendo possível encontrar algumas de suas espécies na região Centro-Oeste em áreas de cerrado, conhecida popularmente como “jarrinha” e “patinho”, entre outros (LORENZZI et al., 2002). Muitas delas são utilizadas na medicina tradicional, como um estomáquico, anti-inflamatório, anti-asmática e abortíferos, bem como um antídoto contra a picada de serpentes e contra diversos tipos de câncer (LOPES et al., 2001). Entre os constituintes encontrados na família Aristolochiaceae destacam-se os terpenóides, lignóides, flavonoides, ácido-graxos e compostos nitrogenados (PACHECO et al., 2009).

A *Aristolochia cymbifera* é uma liana herbácea de folhas simples, pecioladas e glabras, com cerca de 15 cm de comprimento. Os ramos são finos e flexíveis, com caule engrossado e casca fissurada. As flores são em forma de urnas, enquanto que os frutos são elipsóides deiscentes, em forma de cápsulas (LORENZI, MATOS e GOMES, 2002). O amplo espectro de atividades farmacológicas desse gênero pode ser justificado pela grande diversidade química (FRANÇA et al., 2003). Por outro lado, o comércio de ervas medicinais que tem em sua essência extratos de espécies do gênero *Aristolochia* é proibido em vários países, por conter entre suas propriedades efeito nefrotóxico, carcinogênico e mutagênico (POON et al., 2007), que podem levar tanto à nefropatia progressiva quanto ao câncer urotelial em humanos (MEINL et al., 2006).

A anatomia vegetal constitui-se em um instrumento de grande importância, no conhecimento prévio de uma espécie, onde além do aspecto descritivo anatômico, pode contribuir para a elucidação de informações relativas ao armazenamento e secreção de metabólitos secundários, através dos dados obtidos pelo estudo de estruturas secretoras (PANIZZA et al., 1982 apud MARQUES, 2008). A caracterização anatômica, através da análise macroscópica (morfologia externa) e microscópica (anatomia interna) de órgãos, tais como as folhas, por exemplo, pode contribuir nas informações taxonômicas da família, principalmente quando são poucas as informações sobre a espécie estudada. Nesse sentido visando conhecer melhor a espécie *A. cymbifera*, o objetivo proposto é verificar a presença e localização de diferentes tecidos, bem como a existência de estruturas com capacidade de armazenamento ou excreção de compostos.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta das amostras

Folhas de *A. cymbifera* foram coletadas de plantas nativas adultas, localizadas na Fazenda São Tomaz Rio do Peixe, no município de Rio Verde-GO, cujas coordenadas de localização são latitude (S) 17°57'56.1'' e longitude (O) 50°57'10.1'', com altitude estimada em 687 metros. Das três plantas selecionadas foram coletadas 10 amostras foliares, com o auxílio de tesoura de poda, para o devido estudo morfológico, de acordo com as metodologias (JOHANSEN, 1940 e O'BRIEN et al., 1964), e histoquímicas de acordo com as metodologias (JOHANSEN 1940 e O'BRIEN & McCULLY, 1981).

2.2 Caracterização anatômica

O material foi fixado em FAA₅₀ formaldeído e ácido acético, por 48 horas, e conservado em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Posteriormente as folhas foram seccionadas transversalmente, com espessura entre 10 e 15 µm, em micrótomo LPC de mesa ou de bancada para Anatomia Vegetal. Os cortes foram deixados em água destilada por alguns minutos, realizando-se a coloração com azul de astra 0,05% pH 4,0 (O'BRIEN et al., 1964), sendo as imagens obtidas em microscópio modelo leica DM500.

Para o estudo da superfície foliar, amostras de 0,25 mm² do terço médio das folhas foram submetidas à dissociação de epiderme com solução de Jeffrey (ácido nítrico 10%: ácido crômico 10%) (JOHANSEN, 1940) onde foram deixadas por 1 dia nesta solução, sendo após lavadas com água destilada, coradas com safranina e montadas em glicerina 50%, para serem fotografadas.

2.3 Caracterizações Histoquímicas

Amostras de folhas frescas não incluídas foram seccionadas transversalmente em micrótomo LPC para Anatomia Vegetal e posteriormente submetidas aos testes histoquímicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Metodologias utilizadas para detectar as principais classes de metabólitos em amostras frescas.

Compostos	Teste Aplicado	Referências
Compostos fenólicos	Cloreto férrico (15 min.)	Johansen, 1940
Compostos fenólicos	Dicromato de potássio (15 min.)	Gabe, 1968
Lignina	Floroglucina ácida (10 seg.)	Johansen, 1940
Proteínas totais	Xilidine Ponceau	O'Brien and McCully, 1981
Amido	Lugol (15 min.)	Furr and Mahlberg, 1981
Lipídeos totais	Sudan IV (30 min.)	Pearse, 1980

2.4 Registros de imagens

As imagens foram obtidas no microscópio de luz (modelo BX61, Olympus) com sistema U-Photo, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização anatômica de *Aristolochia cymbifera*

A morfologia da folha de *A. cymbifera* apresentou padrões anatômicos semelhantes aos encontrados em *Aristolochia birostris* e *Aristolochia papilares* (MALHEIROS, 2012), indicando similaridade com os padrões descritos, para espécies da família Acanthaceae (METCALFE e CHALK,1950).

A folha possui estômatos apenas na face abaxial inferior caracterizando-a como hipoestomática e quando possui estômatos só na fase de baixo da folha e em vista frontal suas células epidérmicas são poligonais e identificadas como ângulos (Figura 1 B).

Em vista frontal, as células epidérmicas propriamente ditas da face adaxial superior são sinuosas (Figura 1 A). Na face adaxial é possível verificar a presença de uma estrutura similar a tricomas glandulares, o que pode indicar capacidade de armazenagem de algum tipo de substância/composto produzida pela planta.

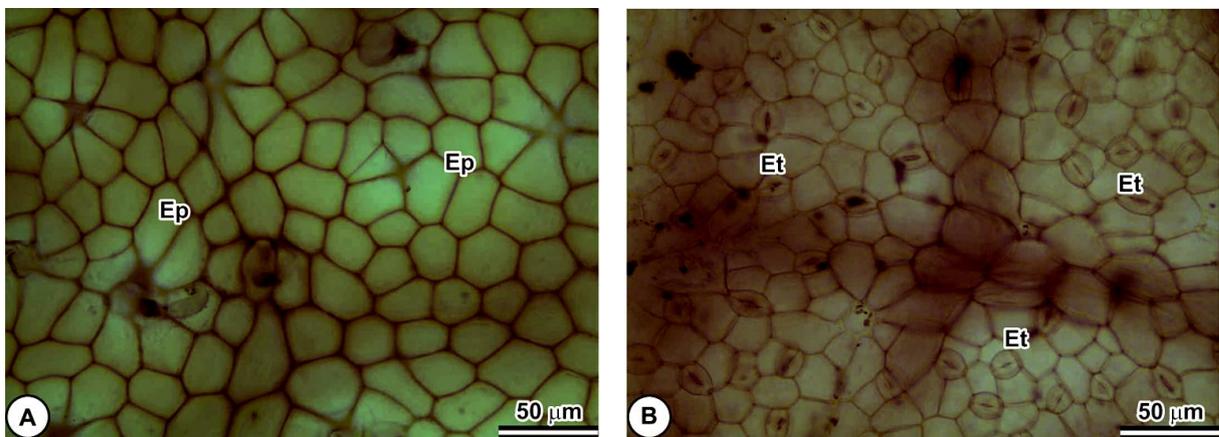


Figura 1. Vista frontal da folha de *Aristolochia cymbifera*. Coloração Safranina. A – face adaxial; B – face abaxial. Ep – epiderme; Et – estômatos.

A epiderme da folha de *A. cymbifera* em secção transversal, apresenta paredes pouco sinuosas e uniestratificadas, sendo revestidas por uma cutícula delgada. As células epidérmicas são em geral, maiores na superfície adaxial, e formadas por células de formato irregular alongadas no sentido horizontal, em geral menores que as células do mesofilo. As células da epiderme apresentam pouco espessamento nas paredes anticlinais. A nervura central apresenta secção transversal plano-convexa e colênquima predominantemente angular, em posição subepidérmica (Figura 2A).

O mesofilo é formado pelo parênquima paliçádico distinto na face adaxial superior e pelo parênquima lacunoso com células de formato e tamanho irregular e muitos espaços intracelulares com uma camada de parênquima paliçádico e três ou mais camadas de parênquima lacunoso, caracterizando-se como mesofilo dorsiventral (Figura 2B). Em

destaque entre os parênquimas observa-se a presença de um ducto, possivelmente representando um armazenador de compostos (Figura 2C).

Em aumento maior observa-se a nervura central formada pelo parênquima de preenchimento e o floema em torno do xilema, apresentando forma irregular (Figura 2D). O xilema apresenta-se em forma de um anel, sendo responsável pela passagem de água e seiva inorgânica que e os nutrientes produzidos pela planta. (Figura 2E e 2F).

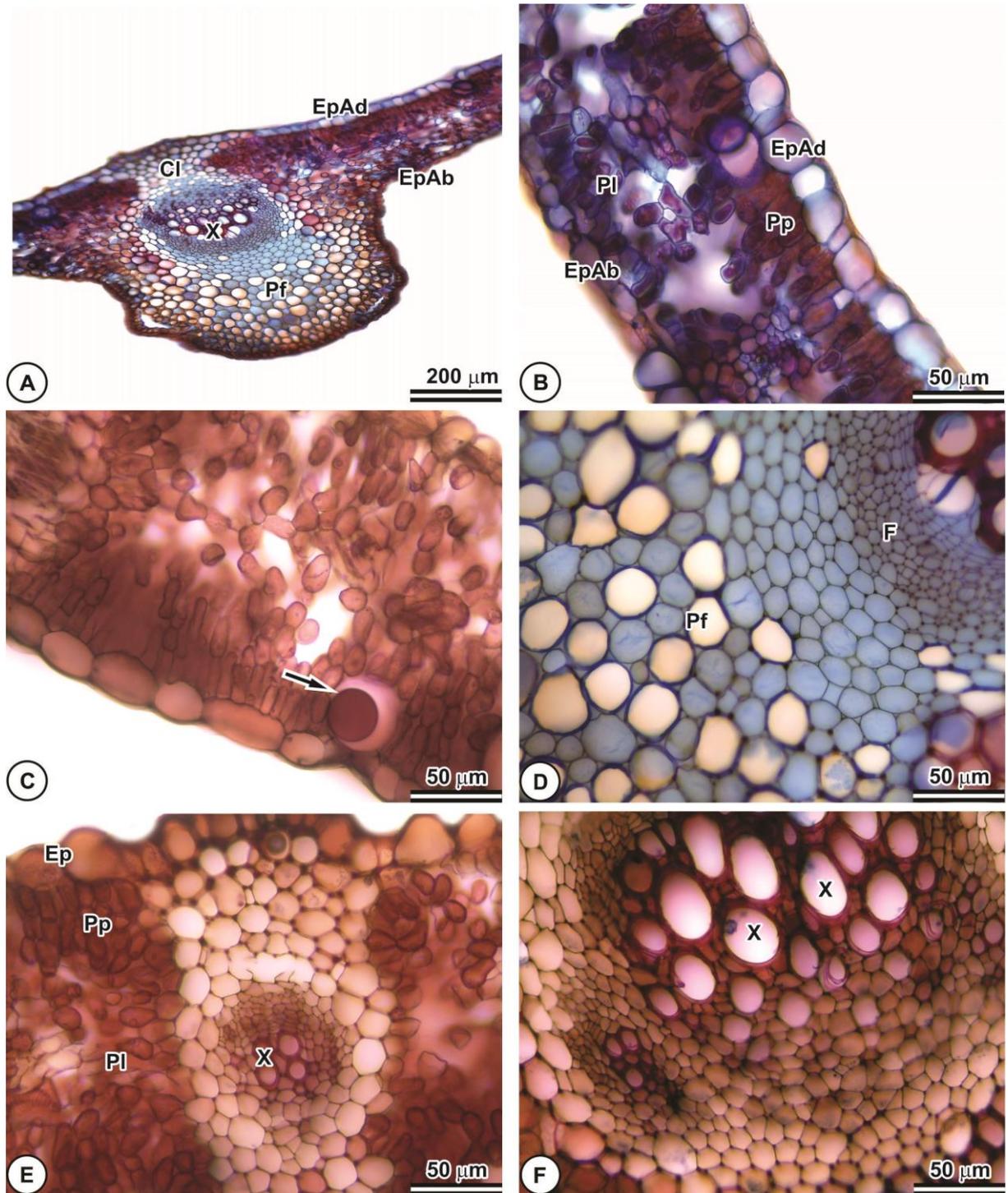


Figura 2. Corte transversal da folha de *Aristolochia cymbifera*. Coloração com Azul de Astra. A–D; destaque da nervura central. B–C; destaque do mesofilo. E–F; feixes vasculares. Ep-epiderme; Ad – axial; Ab – abaxial; Cl – colênquima; Fl – floema; X – xilema; Pf- parênquima fundamental; Pp – parênquima paliçádico; Pl – parênquima lacunoso.

3.2 Histoquímica da folha de *Aristolochia cymbifera*

A reação positiva com Floroglucinol demonstrou através da coloração arroxeada a presença de lignina, nos elementos dos tecidos vasculares (Figura 3 A).

Os testes histoquímicos com Dicromato de potássio e Cloreto férrico II revelaram à distribuição de compostos fenólicos em algumas células epidérmicas (Figura 3 B-C).

Uma pequena quantidade de lipídeos de reserva foi observada, através da reação positiva para Sudan IV, também na região da cutícula (Figura 3 D). Por outro lado, uma ampla distribuição de amido, foi evidenciada com o teste de Lugol, nas regiões do parênquima de preenchimento (Figura 3 E). Para os demais testes histoquímicos o resultado foi negativo, portanto não houve presença de proteínas.

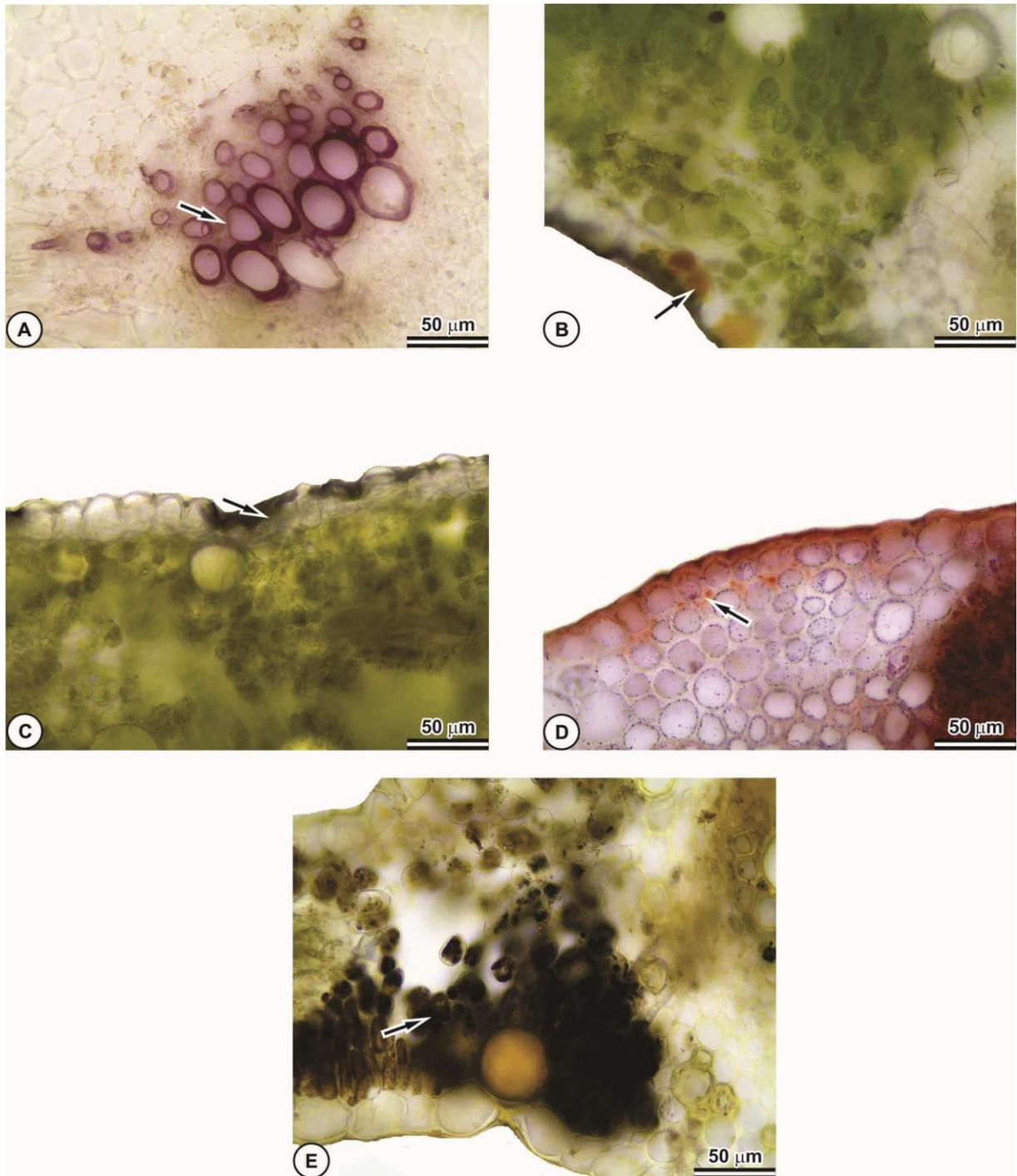


Figura 3. Testes histoquímicos em secções transversais da folha de *Aristolochia cymbifera*. A; lignina (roxo). B; compostos fenólicos (castanho). C; compostos fenólicos (enegrecidos). D; lipídeos (vermelho). E; amidos (parênquima de preenchimento).

CONCLUSÃO

Anatomicamente a espécie estudada *A. cymbifera* demonstrou características como: estômatos apenas na face abaxial, com presença de parênquima clorofiliano dorsiventral no mesófilo, constituído por apenas uma camada de parênquima paliçádico, seguido por camadas de células do parênquima esponjoso. Histoquimicamente os testes que mais se destacaram foram o Floroglucinol que revelou a presença de lignina nos elementos de vasos. O lugol evidenciou uma grande porção de amido no parênquima de preenchimento e por fim o Sudan IV indicando gotículas de lipídios na nervura central próximo a epiderme. Os resultados obtidos no estudo anatômico contribuíram para despertar o interesse de novos estudos sobre a espécie, bem como geraram informações que indicam a possibilidade de produção de algum composto pela espécie, evidenciados pela presença de estruturas de armazenamento, como tricomas glandulares na epiderme adaxial e ductos entre os parênquimas paliçádico e esponjoso.

REFERÊNCIAS

- CARIBÉ, J.; CAMPOS, J. M. **Plantas que ajudam o homem**. São Paulo, SP: Pensamento, 1991. 321p.
- CHAN, Y. Y.; LEU, Y. L.; WU, T. S. 1999. **The constituents of the leaves of *Aristolochia heterophylla* Hemsl.** Chem Pharm Bull 47: 887-889.
- DUARTE M. C. T., LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A. (2006) **Activity of Essential Oil from Brazilian Medicinal Plants on *Escherichia coli***. J. of Ethnopharmacol., In Press.
- FRANÇA, V. C.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. 2003. **Physcion and dihydrocarinatin from *Aristolochia birostris***. Biochem. Syst. Ecol. 31: 1341-1343.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** 44: 153-159.
- GABE, M. Techniques histologiques. Paris:Masson & Cie, 1968. 1113p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. Incl., 523 p. 1940.
- LORENZZI, H.; MATOS, J. A.; GOMES, O. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.324, 2002.
- LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. 2001. Phytochemistry of the **Aristolochiaceae family**. In: **Research Advances in Phytochemistry**, ed.Kerala: Global Research Network, v.2, p. 19-108.
- MALHEIROS, S.G.L. Estudo farmacobotânico de seis espécies de uso medicinal no Nordeste brasileiro. Dissertação de mestrado – UFPB/CCS. João Pessoa, 2012.
- MEINL,W.; PABEL, U.; OSTERLOH-QUIROZO, M.; HENGSTLER, J. G.; GLATT, H.; J. Cancer. 2006, 118, 1090; MERTINEZ, M. C. M.; NORTIER, J.; VEREER-MARTINEZ, M. C. M.; NORTIER, J.; VEREER-STRAETEN, P.; VANHERWEGHEM, J. L.; Nephrol Dial.Transplant. 2002, 17,408; CHENG, C. L.; CHEN, K. J.; SHIH, P. H.; LU, L. Y.; HUNG, C. F.; LIN, W. C.; GU, J. Y.; Cancer Lett. 2006, 232-236.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of dicotyledons, vol. 2. Claredon Press. Oxford. 1950.
- O' BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltda.

PACHECO, A.G.; OLIVEIRA, P. M.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCANTARA, A. F. C.; *Molecules*. 2009, 14, 1245; Wu, K. M.; FARRELLY, J. G.; UPTON, R.; CHEN, J.; *Phytomedicine* 2007, 14, 273; PALMEIRA JÚNIOR, S. F.; CONSERVA, L. M.; CORRÊA, M. S. S.; GUILHON, G. M. S. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* 2002, 30, 701; SILVA-BRANDÃO, K. L.; SOLFERINI, V. N.; TRIGO, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* 2006, 34, 291.

PANIZZA, S.; SCAVONE, O.; ROCHA, A. B. 1982 apud MARQUES. 2008. **Morfodiagnose da maconha(Cannabis sativa L.)**.*Rev Cienc Farm* 4: 39-45.

PEARSE, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. V. II. 4^a ed. Edinburg: Churchill Livingstone.

POON, W. T.; LAI, C. K.; CHAN, A.Y. W.; *Hong Kong J. Nephrol.* 2007, 9, 7.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. 2002. **Plantas inseticidas**. p. 751-766. In: SIMOES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC.