

CARACTERIZAÇÃO MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE *Hyptis rubicunda* POHL ex BENTH. (LAMIACEAE), OCORRENTE NA SERRA DOURADA, GOIÁS, BRASIL

Aline Silva de Castro¹
Helena Dias Ferreira²
Maria Helena Rezende²
Maria Tereza Faria³

RESUMO

As Lamiaceae são reconhecidas por sua importância econômica e etnofarmacológica. O gênero *Hyptis* pertence às Lamiaceae com cerca de 400 espécies, no Brasil são encontradas 202 espécies, sendo 146 endêmicas. O objetivo desse estudo foi caracterizar morfológicamente e anatomicamente o caule e a folha da espécie *Hyptis rubicunda* Pohl ex Benth., visando auxiliar na caracterização desta espécie e contribuir com novos dados para o grupo. A espécie foi coletada na Serra Dourada, Mossâmedes, Goiás. Para o estudo anatômico utilizaram-se as técnicas usuais em anatomia vegetal, realizando-se seções paradérmicas da lâmina foliar, além de seções transversais da do caule e folha. O padrão de venação é do tipo craspedódroma semicraspedódroma com nervuras até a quarta ordem. A lâmina foliar é hipoestomáticas, com estômatos do tipo diacíticos e raros anisocíticos. Em ambas as faces do limbo ocorrem tricomas tectores uni e pluricelulares, glandulares, peltado e capitados. O mesofilo dorsiventral; nervura principal em seção transversal apresenta contorno plano-convexo. O Sistema vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto, presença de hidatódios marginais. O pecíolo e o caule possuem tricomas. Os testes histoquímicos detectaram-se lipídios principalmente nos tricomas glandulares, compostos fenólicos nos tricomas tectores, amido e sílica na região das células basais dos tricomas tectores. Os dados obtidos neste trabalho contribuirão para o estabelecimento de parâmetros de identidade botânica, podendo fornecer subsídios para a taxonomia, bem como compreender as estratégias de adaptação da espécie ao seu ambiente natural.

Palavras chave: tricomas tectores e glandulares, venação semicraspedódroma, hipoestomatica

¹ Aluno do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura- Faculdade Araguaia

² Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade

³ Professora Titular do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura- Faculdade Araguaia; Professor orientador do Curso Especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino de Biologia (ETAEB)- UFG

INTRODUÇÃO

As Lamiaceae possuem distribuição cosmopolita com cerca de 258 gêneros e 7.193 espécies (APG III, 2009; YUAN *et al.*, 2010) amplamente distribuídas nas regiões tropicais, mas ausentes em regiões frias de grandes altitudes e latitudes (JUDD *et al.*, 2009). No Brasil, existem 34 gêneros e mais de 498 espécies nativas (HARLEY *et al.*, 2014).

As Lamiaceae são reconhecidas por sua importância econômica e etnofarmacológica (MENEZES, 1994). Muitas espécies produzem óleos essenciais com propriedades medicinais, outras possuem potencial paisagístico e algumas são condimentos importantes na culinária (HARLEY; REYNOLDS, 1992), sendo relativamente bem estudada do ponto de vista fitoquímico.

Várias espécies de Lamiaceae integram o elenco de plantas medicinais. Atividades antimicrobianas, citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, e inseticida foram encontradas para substâncias isoladas de plantas de espécies desta família (FALCÃO; MENEZES; 2003).

De acordo com RICHARDSON (1992) são encontrados em espécies de Lamiaceae metabólitos secundários com atividades cardiovasculares (diterpenos labdanos de *Plectranthus forskohii* Wild), atividades como agentes antineoplásicos (sesquiterpenos isolados de *Salvia hypoleuca* Benth.), alucinogênicas (*Salvia divinorum* Epl. & Jativa), terpenóides e substâncias fenólicas com efeitos alopáticos (*Leonurus sibiricus* L.), e algumas também ricas em muitos tipos de flavonóides, os quais têm sido frequentemente usados com propósitos quimiotaxonômicos (TOMÁS-BARBERÁN, 1990).

Hyptis Jacq. pertence as Lamiaceae sendo considerado um dos principais na gêneros da família na América do Sul, principalmente na Guiana e nos campos brasileiros (HARLEY *et al.*, 2004). No Brasil são encontradas 202 espécies, sendo 146 endêmicas (HARLEY *et al.*, 2010). *Hyptis* está posicionado na subtribo Hyptidinae, esta apresenta uma variação na estrutura anatômica foliar útil para a identificação taxonômica de suas espécies (HARLEY *et al.*, 2004). Atualmente a circunscrição do gênero foi profundamente modificada a partir do trabalho de Harley & Pastore (2012), com o reconhecimento de diversos novos gêneros.

Ferreira (2009) estudou 86 espécies de *Hyptis* do Cerrado de Goiás sob ponto de vista morfo-anatômico e fitoquímico que muito contribuíram para o conhecimento deste gênero.

A utilização da anatomia na taxonomia e sistemática ocorre há cerca de 150 anos e é útil tanto para a identificação prática quanto para a caracterização das relações filogenéticas entre as plantas (JUDD *et al.* 1999, 2009). Metcalfe & Chalk (1983) afirmam que, associada

aos aspectos ecológicos e comparativos, pode ainda fornecer subsídios valiosos para o estudo de uma determinada espécie.

A Histoquímica vegetal baseia-se em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e do conteúdo celular (COSTA; PROENÇA DA CUNHA 2000). São métodos de análise qualitativa e quantitativa dos componentes celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e elementos iônicos que ocorrem no meio celular (GERSBACH *et al.*, 2001).

Este trabalho faz parte de um projeto que visa estudar as espécies de *Hyptis* ocorrentes em Goiás e Tocantins procurando obter dados que possam servir como subsídios para resolver problemas taxonômicos, reconstrução filogenética, distribuição geográfica do grupo e dados fitoquímicos, bem como compreender as estratégias de adaptação das espécies ao seu ambiente natural.

Considerando o acima exposto, foi realizado o estudo morfo-anatômico e histoquímico da espécie *Hyptis rubicunda* Pohl ex Benth., visando auxiliar na caracterização desta espécie e contribuir com novos dados para o grupo e realizar testes histoquímicos com a finalidade de esclarecer que estruturas anatômicas funcionam como sítio de armazenamento e produção de metabolitos secundários.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal - A espécie utilizada neste estudo foi coletada na Reserva Biológica Prof. Ângelo Rizzo- Serra Dourada, Mossâmedes, Goiás. Coordenadas 16°04'25,8" S, 50°11'12,8" W, 1021 m alt. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Heleno Dias Ferreira. A exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Caracterização morfológica da espécie - A descrição morfológica inicial das espécies e o registro fotográfico foram realizados no campo com câmera digital NIKON COOLPIX L6 e as complementações de medidas, análise e descrições no laboratório de Anatomia Vegetal (UFG), por meio da observação à vista desarmada e também com o auxílio de microscópio estereoscópico, literatura especializada.

Com o objetivo de evidenciar o padrão de venação, as folhas foram submetidas ao processo de diafanização, segundo método proposto por Shobe & Lersten (1967), com as seguintes modificações sugeridas por Fernandes (2007). O processo consistiu na utilização de esponja, água destilada e detergente para a limpeza das folhas, com intuito de remover o excesso de cera e acelerar o processo da diafanização. Após o tratamento inicial, as folhas foram imersas

em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (após este período, as folhas foram lavadas em água destilada com 3 trocas de 10 min. cada); em seguida foram colocadas numa solução de hipoclorito de sódio a 12% (lavando novamente em água destilada 3 trocas, 10 min. cada); logo após foram desidratadas em série etanólica crescente (30, 50, 70, 95%, por 20 min. em cada etapa); logo a seguir passou na solução de xileno-etanol 100% 1:1 (1 hora); e coloração com safranina 1% em mistura de etanol 100% e xilol (1:1, v/v). O tempo de permanência do material botânico nas soluções variou de espécie para espécie. As folhas foram distendidas em placas de vidro, tendo como meio de montagem resina sintética (PAIVA *et al.* 2006). Para o estudo da rede menor de nervuras, fragmentos do terço mediano (região nervura central e bordo) da lâmina foliar diafanizadas foram montados em lâminas permanentes. Para a análise do padrão de nervação foram confeccionadas a partir das próprias placas de vidro que serviram como negativos e scaneadas. Para a descrição e classificação dos padrões de nervação utilizaram-se os tipos básicos definidos por Hickey (1974 e 1979) e Manual Leaf Architecture (2009).

Caracterização anatômica das espécies - Para análise anatômica foram utilizadas quatro folhas totalmente expandidas retiradas de um ramo adulto de cada um dos dois indivíduos da espécie. Do caule foram retirados fragmentos 1º ao 3º a partir do ápice e das folhas, região mediana pecíolo e da lâmina foliar (bordo, entre - nervura e nervura central). As amostras foram fixadas em FAA₇₀ (álcool etílico a 70%, ácido acético e formol) por um período de 24 ou 48 horas e posteriormente preservadas em álcool etílico 70%.

A confecção das lâminas histológicas foi realizada a partir de secções transversais e paradérmicas da lâmina foliar e secções transversais do caule, à mão livre.

As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 6%, lavadas em água destilada e em seguida submetidas à dupla coloração com fucsina básica 0,1% e azul de Astra 0,3% na proporção 1:3. Posteriormente as secções foram desidratadas em série alcoólica etílica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e pós-desidratadas em xilol e álcool (1:1) e xilol puro (JOHANSEN, 1940).

As secções foram montadas entre lamina e lamínula utilizando-se resina sintética incolor Acrilex 500®, (PAIVA *et al.*, 2006). A fim de reconhecer alguns constituintes celulares foram realizados os testes histoquímicos, em material fresco, sem qualquer tratamento. As amostras foram envoltas em papel alumínio e congeladas para a preservação de suas características bioquímicas até o preparo das secções, sendo que, para cada teste foram feitas três repetições

por espécie. Foram utilizadas secções feitas à mão livre e submetidas a reagentes específicos conforme tabela abaixo:

Tabela 1. Testes histoquímicos utilizados na detecção de compostos metabólicos nas secções transversais da lâmina foliar de *Hyptis rubicunda* Pohl ex Benth.

Grupos de Metabólitos	Em luz Visível
Amido	Lugol (Jonhasen, 1964).
	Cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Compostos fenólicos	Dicromato de potássio (Gabe 1968).
	Cloreto férrico (Johansen, 1940).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Compostos lipofílicos	Sudan Black B (Jensen, 1962).
	Sudan IV (Jensen, 1962).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
Proteínas	Azul brilhante de comassie (Fisher, 1968).
	Azul mercúrio de bromofenol (Mazia <i>et al.</i> , 1953).
Sílica	Cristais de fenol (Johansen, 1940).
Lignina	Cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962).
	Steinmetz (Costa, 1970 e 2001).
	Floroglucinol acidificado (Johansen, 1940; Kneebone, 1962).

As fotomicrografias referentes às estruturas anatômicas foram feitas em fotomicroscópio modelo ZEISS-AXIOSKOP acoplado à câmara clara, com utilização de filme fotográfico ASA 100. As escalas que acompanham as ilustrações foram obtidas nas mesmas condições ópticas.

RESULTADOS

Caracterização morfológica da espécie Hyptis rubicunda Pohl ex Benth.

(Fig. 1A- F)

ERVA até 2m de altura, com caules quadrangulares, ramos levemente aveludados, escabrosos ao longo dos ângulos; FOLHAS ovadas, 4,5-11,5 cm de compr., 2,5- 5 cm de larg.; ápice agudo ou acuminado, base arredondada ou estreitada, margem irregularmente crenado-serreada, face adaxial levemente hirsuta, face abaxial aveludada, pecioladas. Pecíolo hirsuto, 3,5-7,0 cm com compr., canaliculados; INFLORESCÊNCIA verticilastros subglobosos,

paucifloros, subsésseis, dispostos em espigas, paniculados; brácteas submembranáceas, elípticas ou lanceoladas, 3-1 mm compr., geralmente glabras no dorso, ciliadas na margem; tubo do cálice na flor viloso externamente, 1mm compr., lacínias setáceas, desiguais, 1,2 mm compr., poucos tricomas longos e esparsos, orifício com tricomas eretos no seio entre os dentes, tubo fruticosos 5-6 mm comprimento; COROLA lilás, tubo 3 mm compr., tricomas glandulares e esparsos, e presença de tectores no terço superior do tubo, esparsos externamente, lobos hirsutos; filetes pilosos, 2 mm compr.; anteras amarelas; lobos do ovário glabros, 0,5 mm de compr.; estilete glabros, articulado na base do ovário. Núcula lisa, oblonga, obtusa, marrom-clara ou escura, 1, 2-1,5 mm compr. (Fig. 1A- F)

Pouco frequente nas áreas de ocorrência. Comumente o dorso das brácteas é glabro e as margens ciliares, mas foi encontrado também nos materiais examinados dorso com tricomas.



Figura1- *Hyptis rubicunda*. A- Aspecto geral das folhas e inflorescência; B-C- Detalhe da inflorescência com verticilastos subglobosos; D- Detalhe da filotaxia oposta; E-F- Flores labiadas lilás.

Arquitetura foliar (Fig. 2A- D)

Folhas simples, opostas, ovadas, membranáceas. Pecíolo longo marrom - esverdeado, canaliculado. Lâminas foliares, verdes, face adaxial levemente hirsuta, face abaxial aveludada; margens irregularmente crenadas- serradas (Fig. 2C); ápice agudo ou acuminado, base arredondada ou estreitada; Venação peninérveas do tipo craspedródomo semi-craspedódromo com nervuras até a quarta ordem, a nervura primaria é de orientação reta, proeminente na face abaxial, com maior calibre na base, atenuando em direção ao ápice. As secundárias apresentam-se, em geral, em oito a seis pares de nervuras que se originam de maneira alterna na base, até o ápice; amplamente espaçadas irregularmente ao longo de toda a folha, cursos curvados; nervuras terciárias originam em ângulo reto, às vezes uniforme, ligam duas nervuras secundárias exmedialmente ramificadas, o modelo de venação é reticulado em polígonos regulares; nervuras quaternárias reticuladas em polígonos regulares; aréolas bem desenvolvidas com quatro lados, raros cinco (Fig. 2 D); vênulas simples e ramificadas presença de nervura marginal coletora, formada pelas terminações das nervuras secundárias, ao se encontrarem na margem da folha em direção ao ápice. Presença de Hidatódios marginais (Fig. 2B).

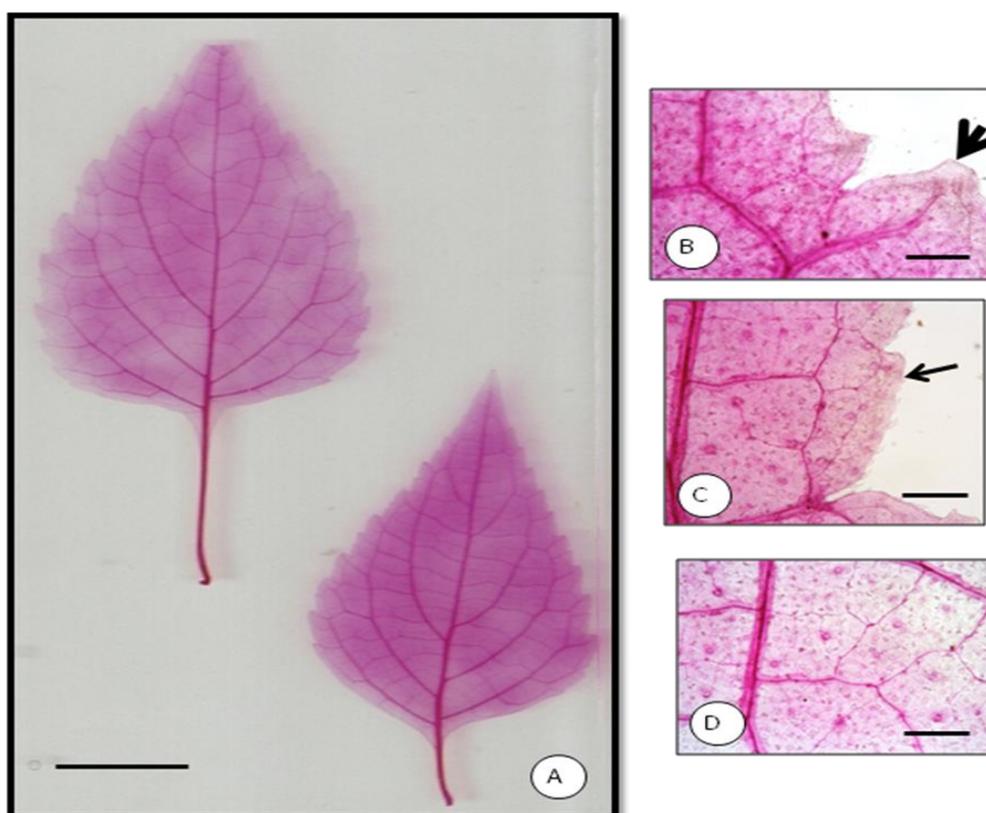


Figura 2. Aspectos da morfologia e arquitetura foliar *Hyptis rubicunda*. A- Folha simples, oposta, ovadas, membranáceas, Pecíolo longo marrom - esverdeado, canaliculado. B- Detalhe dos Hidatódios marginais; C- margens irregularmente crenadas- serradas; D- aréolas bem desenvolvidas com quatro lados, raros cinco. Barras = 1,0 cm (A); 30 μ m (B-D);

Anatomia da lâmina foliar

Limbo

Em secção transversal a lâmina foliar de *H. rubicunda* apresenta-se com epiderme adaxial uniestratificada, as células são retangulares com eixo anticlinal menor que o periclinal, as paredes periclinais externas e internas são levemente arredondadas e espessas, as anticlinais predominantemente retas essas células são recobertas por cutícula delgada (Fig. A), densamente pilosa com predominância de tricomas tectores curtos, entremeados por tricomas longos, presença de tricomas glandulares de dois tipos: peltados e capitados.

Em vista frontal, as células epidérmicas possuem formas e tamanhos variáveis, tendo de 4- 8 lados, mais frequentemente. Suas paredes são espessas e onduladas (Fig. B).

A epiderme na superfície abaxial, também apresenta-se uniestratificada, cujas células são menores que as da adaxial; a cutícula que recobre essa superfície se comporta como a adaxial. Densamente pilosa com predominância de tricomas glandulares peltados localizados em sulcos na epiderme e tricomas tectores uni e pluricelulares simples. Em vista frontal, as células epidérmicas apresentam paredes com contornos sinuosos (Fig. C).

A folha é hipostomatica, com estômatos predominantemente diacíticos e raros anisocíticos. Em secção transversal, observa-se que os estômatos encontram-se nivelados em relação às demais células epidérmicas as espécies.

Em ambas as faces da epiderme ocorrem numerosos tricomas tectores e glandulares. Os primeiros (Fig. 10A-J) são uni ou pluricelulares (duas a oito células em série únicas, terminando em ponta aguda (Fig. 10H), eretos ou curvos, levemente lignificados e revestidos por cutícula granulosa. As células epidérmicas na base desses tricomas (até oito células) assumem formato poligonal e dispõem-se em roseta. Os tricomas glandulares possuem morfologia diversa, sendo capitados (Fig. 9E, G, H, I) e peltados (Fig. 9B-F). Nos tricomas capitados, o pedicelo tem comprimento variado, podendo ser uni (Fig. E) ou pluricelular (Fig. G, H, I) e a cabeça globosa. Os tricomas peltados se caracterizam por pedicelo curto e por cabeça secretora, composta de quatro células secretoras. Podem estar inseridos em leve depressão e apresentar destacamento da cutícula na porção glandular.

O mesofilo, em secção transversal, é dorsiventral (Fig. 4A), o parênquima paliçádico é compacto e possui uma única camada de células alongadas (Fig. 4A). O parênquima lacunoso está organizado em número de duas a cinco camadas, que apresentam tamanhos e formatos variados, presença de células braciiformes, resultando na formação de espaços intercelulares de tamanhos variados. Presença de inúmeras gotículas lipídicas (Fig. 3A).

Nas nervuras de médio e pequeno porte, os feixes vasculares são colaterais, e apresentam-se envolvidos por bainha conspícua de células parenquimáticas constituindo a endoderme (Fig. 4B).

Nervura principal

Em secção transversal, apresenta contorno plano-convexo. A epiderme na face adaxial apresenta-se uniestratificada, com células retangulares, recobertas por cutícula espessa na face adaxial e delgada na abaxial. Densamente pilosas, predominando tricomas tectores uni a pluricelulares e tricomas glandulares peltados.

Observam-se no córtex subjacente à epiderme uniestratificada, ocorre o colênquima angular, consistindo de 8-12 camadas na face adaxial e aproximadamente dois a quatro estratos próximos à abaxial, seguidas de 5-8 camadas de células parenquimáticas isodiamétricas de tamanhos variáveis.

O parênquima clorofiliano do mesofilo se estende levemente em direção à face abaxial da nervura principal.

O sistema vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto. Presença de dois feixes acessórios (traços foliares) em direção à face adaxial. Os feixes estão envolvidos por uma faixa estreita de esclerênquima com 3-6 camadas de células às vezes interrompidas por células parenquimáticas.

A região medular é constituída por células parenquimáticas com paredes espessadas, isodiamétricas de tamanhos variados. Em direção à face adaxial essas paredes se tornam mais espessas e o lume celular menor (Fig. 4C)

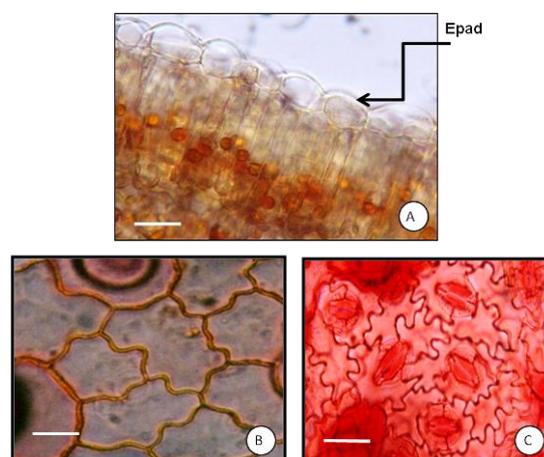


Figura 3. Aspectos da epiderme de *Hyptis rubicunda*. A- Secção transversal do mesofilo, evidenciando cutícula delgada e gotículas lipídicas. B- corte paradérmico da face adaxial com células onduladas; C- corte paradérmico da face abaxial com células sinuosas. Barra= 20µm (A- C).

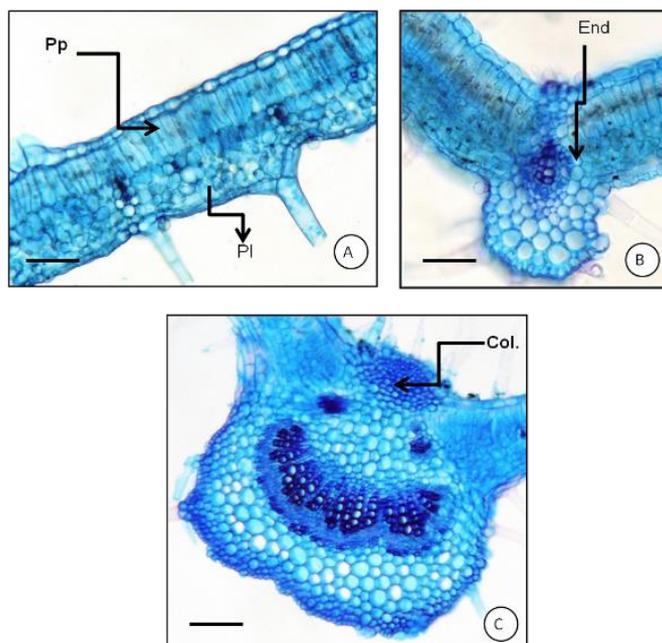


Figura 4. Secções transversais da lâmina foliar *Hyptis rubicunda*. A- Aspecto geral do mesofilo dorsiventral; B- Nervura de pequeno porte com extensão de bainha parenquimática; C- Aspecto geral da nervura principal com contorno plano – convexo, detalhe do colênquima. Barras = 50 μ m (A); 130 μ m (B- C).

Bordo

Em secção transversal, a região do bordo, foi à estrutura que apresentou maior variação na forma devido à irregularidade da margem crenada- seriado. Observou – se que entre o último feixe vascular e a epiderme ocorre parênquima. Em algumas regiões da lâmina foliar o bordo é levemente revoluto arredondado (Fig. 5A), levemente revoluto acuminado (Fig. 5B), o bordo é revoluto e apresenta forma acuminada com presença de hidatódios constituídos por traqueídes e estômatos modificados em poros (Fig. 5C- D) e forma arredondada (Fig. 5E), nessa região as células epidérmicas apresentam cutícula mais espessa e maior concentração de tricomas tectores uni e pluricelulares, o último feixe vascular é parcialmente envolvido por uma camada de células de parênquima formando uma bainha.

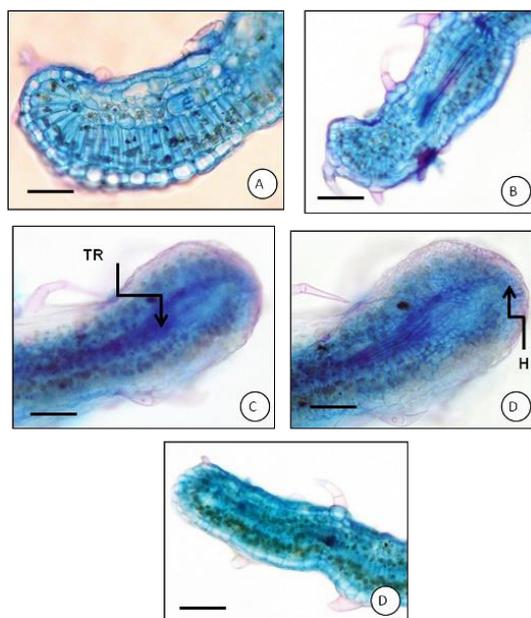


Figura 5. Secções transversais da lâmina foliar *Hyptis rubicunda*. Região do bordo. A- Bordo levemente revoluto arredondado; **B-** Bordo levemente revoluto acuminado; **C-** Bordo arredondado com hidatódio. **D-** Detalhe do Hidatódio; **E-** Bordo arredondado. Barras = 70 μ m (A-E).

Pecíolo

Em secção transversal, a região mediana do pecíolo, possui formato praticamente plano-convexo com duas projeções ou alas laterais expandidas na região distal. A epiderme uniestratificada é constituída por células de tamanhos reduzidos, as paredes periclinais externas exibem contorno convexo e encontram-se revestidas por cutícula espessa. Presença de tricomas tectores e tricomas glandulares peltados e capitados. Nas alas, observam-se cerca de oito a nove camadas de colênquima angular e, junto às faces adaxial de oito a nove, e abaxial dois a três estratos, que se interrompe por células parenquimáticas rumo às alas, o córtex é constituído de parênquima constituído de células com paredes espessas. Em algumas regiões do córtex foram observadas células parenquimáticas com paredes delgadas. (Fig. 6A).

O sistema vascular é do tipo colateral e apresenta conformação em arco aberto com quatro feixes dispostos adaxialmente e abaxialmente. Os elementos condutores do xilema apresentam-se dispostos em fileiras radiais (Fig.6B). As células do parênquima medular possuem tamanhos variados com lume maior na região central da medula.

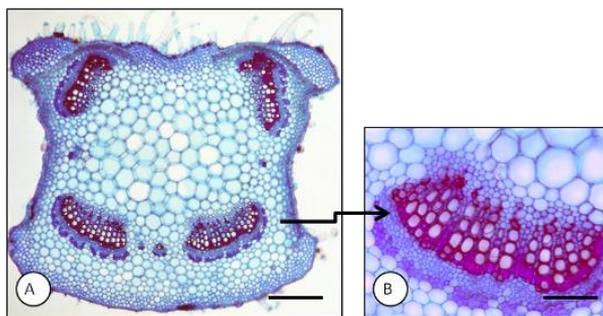


Figura 6. Secção transversal da região mediana do pecíolo *Hyptis rubicunda*. A- Aspecto geral; B- Detalhe do feixe vascular. Barras = 100 μ m (A); 20 μ m (D).

Caule

Em secção transversal, possui contorno quadrangular na região do 1^o entrenó e sexangular na região do 3^o, revelando costelas evidentes (Fig. 8A e 8C). A epiderme, nas duas regiões é uniestratificada, constituída por células de tamanhos variáveis, as paredes periclinais externas exibem contorno convexo e são revestidas por cutícula espessa.

A região 1^o entrenó a região cortical é constituída por colênquima angular subepidérmico, com 3 a 4 camadas de células e parênquima formado por 2 - 3 camadas de células clorofiladas. Presença de endoderme com células de tamanhos e formatos variados e fibras pericíclicas (Fig. 8 A-B). Em estrutura primária o sistema vascular é colateral. Nessa fase de desenvolvimento do caule foi registrado início de crescimento secundário no cilindro vascular. A região medular muito desenvolvida é constituída por células parenquimáticas delgadas e tamanhas variadas e numerosas tricomas tectores e glandulares estão presentes. Os tricomas tectores são uni e pluricelulares, podendo apresentar ocasionalmente células desidratadas, e são revestidos por cutícula granulosa. Presença de tricomas glandulares. Na região das costelas o colênquima compõe-se de 12 a 15 camadas e é angular (Fig. 8B).

Na região do 3^o entrenó mostra que no córtex as células mais internas do colênquima se diferenciam em fibras indicando crescimento secundário, limitando internamente a região cortical, evidencia-se uma bainha amilífera.

No sistema vascular, o câmbio revela-se mais ativo na região das costelas. Calotas de células esclerenquimáticas em diferentes estágios de lignificação apõem-se ao floema e o xilema é completamente lignificado (Fig. 8D). A medula é composta por células parenquimáticas relativamente grandes e estas são levemente lignificadas na zona perimedular.

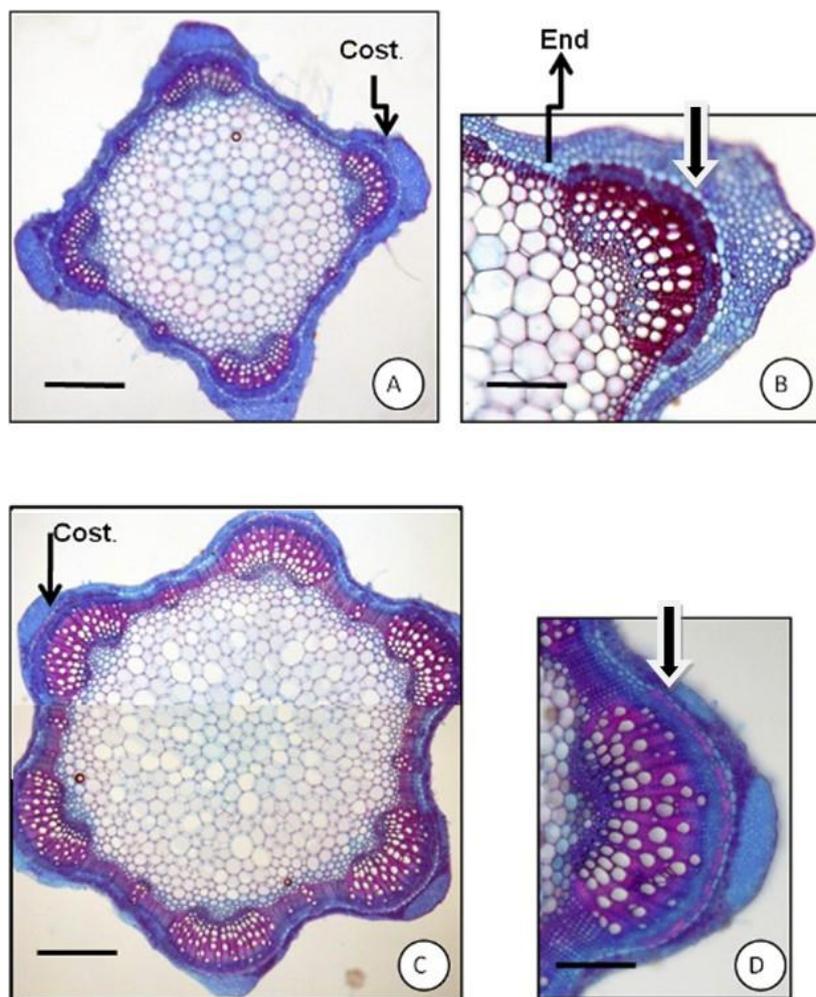


Figura 8. Secções transversais do caule de *Hyptis rubicunda*. **A-** Aspecto geral da região 1^o entrenó do caule, forma quadrangular. **B-** Detalhe da costela e feixes vasculares. **C-** Aspecto geral da região do 3^o entrenó, forma sexangular **D-** Detalhe da costela e feixes vasculares. Seta: Detalhe da Bainha amilífera. Barras = 100µm (A-D).

Histoquímica

Em *H. rubicunda* foi detectado compostos lipofílicos detectado com os reagentes sudan IV Sudan Black e steinmetz: cutina, gotículas lipídicas no tecido parenquimático, principalmente no mesofilo (Fig. 9A) e em todos os tricomas glandulares: peltado e capitado (Fig. 9 B-E)

Grãos de amido foram evidenciados principalmente, no parênquima clorofiliano próximo à face abaxial e em células isoladas da epiderme sendo confirmados com análise em luz polarizada.

Os compostos fenólicos foram observados, com testes de Dicromato de potássio e cloreto férrico, principalmente na epiderme, no mesofilo nos tecidos parenquimáticos da

nervura principal, nos tricomas glandulares (Fig. 9F-I) e nas células basais e ápice dos tricomas tectores (Fig. 10F-H e J)

As nervações foliares de todas as espécies analisadas são ricas em lignina, detectadas nas fibras ao redor dos feixes vasculares e nos elementos de vaso.

Foi encontrada sílica em todas as células basais dos tricomas tectores, que se confirmou com testes com cristais de fenol.

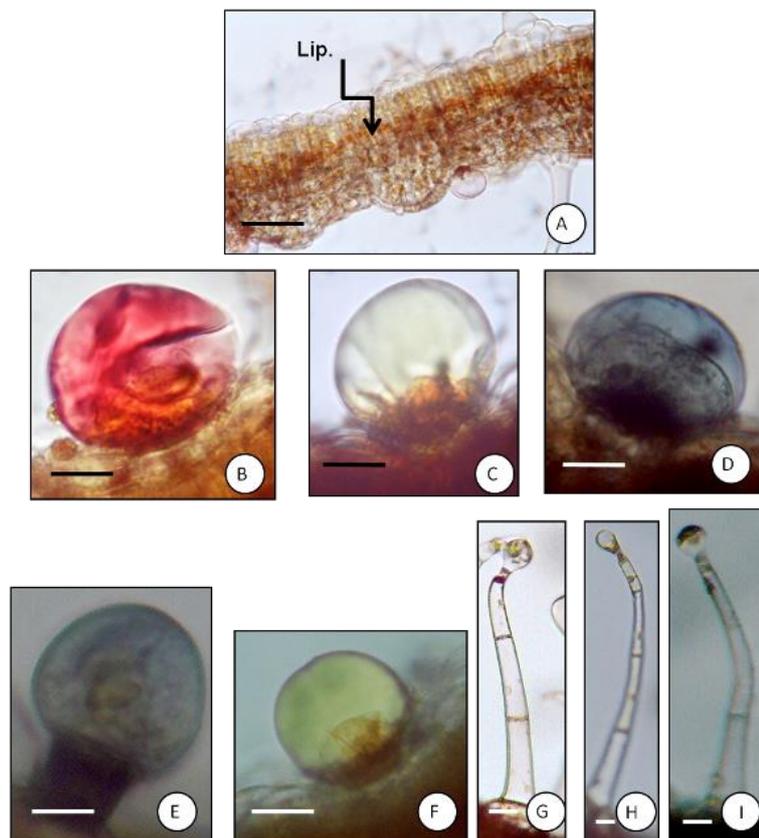


Figura 9. Secções transversais da lâmina foliar de *Hyptis rubicunda* - Testes Histoquímicos. **A-** detalhe do mesofilo evidenciando gotas lipídicas no mesofilo e cutina, reagente sudan IV. **B-** tricoma glandular peltado, reação positiva para lipídios, reagente sudan IV. **C-** tricoma glandular peltado, reação positiva para lipídios, reagente steinmetz; **D-** tricoma glandular peltado, reação positiva para lipídios, reagente sudan Black; **E-** tricoma glandular capitado, reação positiva para lipídios, reagente sudan Black; **F-** tricoma glandular peltado, Reação positiva para compostos fenólicos totais, reagente Dicromato; **G-H-I-** tricomas glandulares capitados, Reação positiva para compostos fenólicos totais, reagente Cloreto férrico. Barras= 30 μ m (A-F); 100 μ m (G, H); 20 μ m (I)

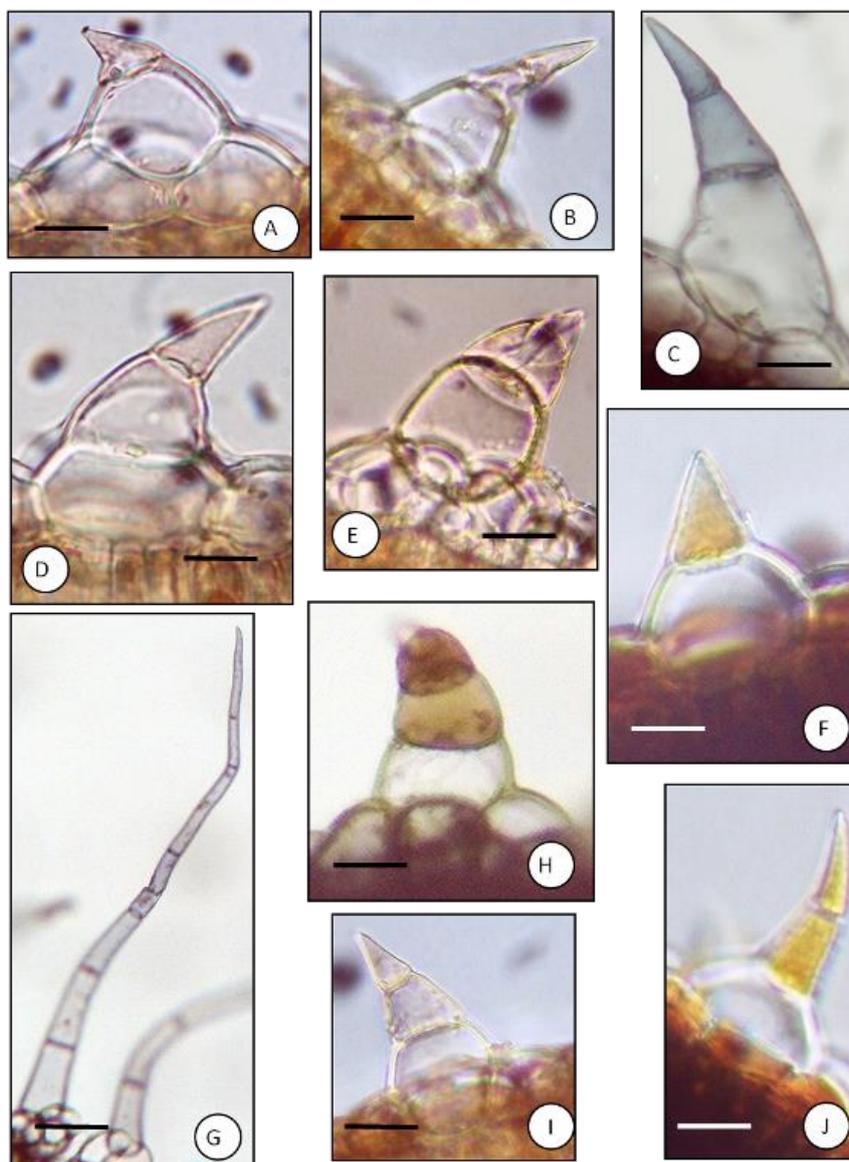


Figura 10. Tricomas Tectores de *Hyptis rubicunda*. - Tricomas Tectores bi a pluricelulares simples encontrados *Hyptis rubicunda*. **F-H-J-** presença de compostos fenólicos nas células ápicas dos tricomas, reagente Dicromato de potássio. Barras = 150 μ m.

DISCUSSÃO

A espécie estudada, apresenta padrão de venação do tipo peninérvea craspedródomo semi-craspedródomo, sendo identificadas nervuras até quarta ordens, pois as venações mais finas formam um retículo relativamente uniforme que não permite diferenciação de calibre entre as mesmas. Isto não é suficiente para a identificação da espécie, mas pode ser utilizado, quando associado a outros caracteres, no reconhecimento da mesma em estágio vegetativo.

Roth- Nebelsick *et al.* (2001) afirmam que existem duas principais funções para a venação foliar: transporte através dos tecidos condutores e estabilização mecânica devido à

presença de elementos esclerificados. Além de prover informações adicionais para propor hipóteses de relações filogenéticas entre espécies ou variedades (LIS, 1992).

Nesse estudo, observou-se que a organização anatômica das folhas de *H. rubicunda* reflete as características gerais observadas para a família por Höhnel (1881); Solereder 1908); Metcalfe & Chalk (1950,1983); Rudall (1979, 1980, 1981, 1986); Faria (2008) e Ferreira (2009). Esses autores ressaltam como características gerais da família: folhas hipoestomáticas estômatos diacíticos e raros anisocíticos, tricomas glandulares peltados e capitados, tricomas tectores simples uni e pluricelulares, feixes vasculares bicolaterais e mesofilo dorsiventral e presença de hidatódio no bordo.

De acordo com Metcalfe & Chalk (1983) as espécies de Lamiaceae se caracterizam pela presença de caule quadrangular, devido a um considerável desenvolvimento de colênquima nas costelas, e no gênero *Hyptis* também se verificam faixas de colênquima entre as mesmas. Metcalfe & Chalk (1983), mencionam ainda a ocorrência de endoderme composta por células parenquimáticas freqüentemente diferenciadas, com paredes completamente ou radialmente suberizadas, em diversos gêneros de Lamiaceae. De modo diverso, neste trabalho foi constatada bainha amilífera.

Existe uma grande variabilidade nos tipos de tricomas glandulares, em relação ao número de células secretoras, no número de células e tamanho do pedúnculo, na quantidade do óleo secretado, na densidade e no seu arranjo na epiderme (METCALFE & CHALK 1983). De acordo com Mauseth (1988), a mesma planta pode apresentar vários tipos de tricomas, bem como podem ocorrer mudanças ao longo do desenvolvimento dos tricomas.

Os dados aqui registrados estão de acordo com os estudos de Werker *et al.* (1985, 1993, 2000), Corsi & Bottega (1999), Gersbach (2002), Ascensão *et al.* (1995, 1999), Serrato-Valentin *et al.* (1997) e kaya *et al.* (2003, 2007) reafirmando que, para cada tipo de tricoma glandular em Lamiaceae observa-se seu próprio arranjo espacial e função, secretando diferentes combinações, ou proporções, de substâncias lipofílicas e hidrofílicas.

Segundo Pearse (1960) em histoquímica distinguem-se substâncias de caráter lipofílico e hidrofílico. Como se têm os lipídios totais e como substâncias de caráter hidrofílico os compostos fenólicos (flavonóides, taninos), ligninas, alcalóides, polissacarídeos, amidos e proteínas.

Nos testes aqui realizados com os reagentes específicos constatou a presença de lipídios totais compostos fenólicos, ligninas e amido.

As substâncias secretadas pelas plantas têm merecido atenção de vários pesquisadores que ao longo dos anos vem procurando elucidar sua natureza química e o que elas representam para o vegetal (FAHN 2000; NOGUEIRA *et al.* 2001), sendo que Metcalfe & Chalk (1983) ressaltam a importância destas substâncias, como subsídios para estudos taxonômicos.

CONCLUSÃO

Os caracteres morfo-anatômicos de *Hyptis rubicunda*, a saber, tricomas tectores e glandulares peltados e capitados, estômatos diacíticos e raros anisocíticos presentes só na face abaxial, mesofilo dorsiventral, caule quadrangular com colênquima conspícuo nas costelas, rara presença de hidatódios no bordo coincidem com os descritos para diferentes gêneros de Lamiaceae. Esses caracteres devem ser considerados em conjunto para auxiliar na identificação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 161, 105–121, 2009.

ASCENSÃO, L., MARQUES, N., PAIS, M.S. Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis Leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, vol. 75, p. 19-29, 1995.

ASCENSÃO, L., MOAT, L., DE M. CASTRO, M. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus Orates*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany*, n. 84, p. 437- 447, 1999.

BORDIGNON, S. A. L. O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) No Rio Grande Do Sul. Dissertação de Mestrado, Instituto De Biociências, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Rio Grande Do Sul, p. 123, 1990.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: Status and classification. *In*: Harley, R. M.; Reynolds, T. *ed.* *Advances in Labiatae science. Royal Botanic Gardens*, Kew, p. 511-522. 1992.

CORSI, G., BOTTEGA, S. Glandular Hairs of *Salvia Officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany*, n. 84, p. 657-664, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia** 3v. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1970.

- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3v. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- COSTA, A.F., PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia – Farmacognosia experimental**. 3ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3 v. 2000.
- FAHN, A. Structure and Function of Secretory Cells. Hallahan, D.I., Gray J.C., Callow, J.A. eds. *Advances In Botanical Research Incorporation Advances in Plant Pathology*, vol. 31: Plant Trichomes: London; Academic Press, 2000.
- FALCÃO, D. Q. & MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. The *Hyptis* nus: an ethnopharmacological and chemical review. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 84, n.3, 69-74, 2003.
- FARIA T. M. Morfologia, Anatomia, Histoquímica e Fitoquímica de espécies do gênero *Hyptenia* (Mart. ex Benth.) R. Harley- Lamiaceae ocorrentes no Cerrado de Goiás. Dissertação de Mestrado, Instituto De Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 2008.
- FERNANDES, S.D.C. Morfologia, anatomia, histoquímica e aspectos fisiológicos da lâmina foliar de espécies de *Clusia* (Clusiaceae). Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- FERREIRA, D. H. Morfologia, taxonomia, Filogenia, Anatomia Foliar e fitoquímicas de Espécies do Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) ocorrentes em Goiás e Tocantins. Tese de Doutorado, Instituto De Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 2009.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RSPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA, p. 220, 1995.
- FISHER, D. B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. GABE, M. **Techniques Histologiques**. Masson & Cie, Paris, 1968.
- GERSBACH, P.V. The essential oil secretory structure of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Annals. Botanic.*, London, vol. 89, p. 255-260, 2002.
- GERSBACH, P.V., S.G. Wyllie and V. Sarafis, A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Anal. Bot.*, 2001.
- GERSHENZON, J., MAFFEI. M., CROTEAU, R. Biochemical and Histochemical localization of Monoterpene Biosyntheses in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha Spicala*). *Plant Physiology*, n. 89, p. 1351-1357, 1989.
- HARLEY, R. M. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. (Labiatae) and its allies. *Kew Bulletin*, Kew, vol. 98, p. 87-95, 1988.

HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. *Advances In Labiatae Science*. United Kingdom. The Royal Botanic Gardens, Kew. 1992.

HARLEY, R., FRANÇA, F., SANTOS, E. P., SANTOS, J. S. *Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008249>). 2010.

HARLEY, R.M. & PASTORE, J.F.B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58: 1-55, 2012

HICKEY, L. J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Metcalfe, CR, Chalk L. (Ed.). *Anatomy of the dicotyledons*, Vol. I. 2nd. Ed. Oxford: Clarendon Press: p. 25-39, 1979.

HICKEY, L. J. Classicacion de la arquitetura de las hojas de dicotlidoneas. *Boletin de La sociedade Argentina de Botânica*, vol. 16, n.2, p. 1-26, 1974.

HÖEHNE, F. C. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinai*s. São Paulo - Rio, Graphicars, p.355, 1939.

HÖHNEL, E. R. **Anatomische Untersuchungen über einige Secretionsorgane der Pflanzen**. *Sitzb. Kaiserl. Akad. Wiss. Math-Natur. Cl.*, vol. 84, p. 565-611. 1881.

JENSEN, W. A. *Botanical Histochemistry, Principles and Practice*. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1962.

JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York, London: McGraw-Hill Book Company, 1940.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 95- 99, 2009.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. *Plant Systematic. A Phylogenetic Approach*. Inglaterra, Sinauer Associates, inc., p. 383-5, 1999.

JUNELL, S. Zur Gynäceummorphologie und Systematik der Verbenaceen und Labiatem. **Symb. Bot. Upsal**. p. 1- 219, 1934.

KAYA, A.; DEMIRCI, B. AND BASER, K. H. C. Glandular Trichomes and essential oils of *Salvia glutinosa* L. *South African Journal of Botany*, vol. 69, p. 422- 427, 2003.

KAYA, A.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C. Micromorphology of glandular Trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany*, vol. 73, p. 29-34, January, 2007.

KNEEBONE, W.R. A simple rapid, precise staining procedure for identification of lignified tissue in grasses. **Crop Science**, vol. 2, p. 268-269, 1962.

LEAF OF ARCHITETURE WORKING GROUP. Manual of leaf architecture- morphological description and categorization of dicotyledonous and net veined monocotyledonous angiosperms, 2009.

LIS, R. A. leaf architectural survey of *Cercocarpus* (Rosaceae) and its systematic significance. **International Journal of Plant Sciences**, vol. 153, n. 2, p. 258-272, 1992.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 568, 1988.

MAZIA, D., BREWER, P. A & ALFERT, M. The cytochemistry staining and measument of protein with mercuric bromophenol blue. **Biol. Bull.** n. 104; p. 57-67, 1953.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae** (Tese de Mestrado). Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. Rio de Janeiro: UFRJ, p. 94. 1994.

METCALFE, C. R. & CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. 11, Oxford: claredon Press., 1983.

NOGUEIRA, P. C.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G. J.; LOPES, A. V & MARSAIOLI, A J. The ecological and Taxonomic importance of flower volaties of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, vol. 56, n. 5, p. 443 – 452, 2001.

PAIVA, J. G. A; FANK-DE- CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P. & GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral 500*: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasil*, vol. 20, p. 257- 264, 2006.

PASTORE, J. F. B. et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. *Taxon* , v. 60 , n. 5, p.1317 - 1329, 2011

PEARSE, A. G. E. *Histochemistry, theoretical and applied*. London: Churchill. Quay, W. B. (1965). In *Progress in brain research*, vol. x, pp. 49-86. Eds. J. A. Kappers & J. P. Schade. Amsterdam: Elsevier Publishing Company. 1960 **Plata**. Tomo VII, *Botánica*, vol. 30, p.153-497, 1949.

RICHARDSON, P.M. The chemistry of the Labiatae: An introduction & overview In: Harley, R. M. & Reynolds, T. (Ed.). **Labiatae, Science. Kent**. Whitstable Litho Ltd, Whitstable. p. 291-297, 1992.

ROTH-NEBELSICK, A.; Uhl, D.; Mosbrugger, V. & Kerp, H. Evolution and function of leaf venation architecture: a review. **Annals of Botany**, vol. 87, p. 553-566, 2001.

RUDALL, P. Flower anatomy of the Subtribe Hyptidinae (labiatae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, vol. 83, p. 251- 262, 1981.

- Rudall, P. Leaf anatomy of Hyptis section Pachyphyllae and related species. **Kew Bulletin**, vol. 41, p. 1017-1025, 1986.
- RUDALL, P. Leaf anatomy of the Subtribe Hyptidinae (Labiatae). **Bot. J. Linn. Soc.** vol. 80, p. 319-340. 1980.
- RUDALL, P. Leaf and twig anatomy of *Eriope*, a xeromorphic genus of Labiatae. **Bot. J. Linn. Soc.** vol.78, p. 157-180, 1979.
- SCHLIEWE, A. M. Morfologia, Anatomia foliar e Fitoquímica de Espécies de Eriope Humb. & Bonpl. Ex Benth. (Lamiaceae) ocorrentes em Goiás. Dissertação de Mestrado, Instituto De Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 2008.
- SERRATO-VALENTIN, G.; BISIO, A.; CORNARA, L.; CIARALLO, G. Structural and Histochemical investigation of the glandular Trichomes of *Salvia aurea* L. leaves and chemical analysis of the essential oil. **Annals of Botany**, London, vol.79, p.329-336, 1997.
- SHOBE, W. R. & LERSTEN, N. R. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. *Botanical Gazette*, vol. 128, n. 2, p.150-152, 1967.
- SOLEREDER, H. Systematic anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Claredon Press, vol.1, 1908.
- STEVENS, P.F. "Angiosperm Phylogeny Website". Version 2 August 2001. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/apweb/2001>.
- THOMÀS-BARBERÀN, F. A., WOLLENWEBER, E. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. **Plant Systematics and Evolution**, n. 173, p. 109-118, 1990.
- WARD, J. H.; Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal American Statistica Association*, vol. 58, p. 238, 1963.
- WATSON, L., AND DALLWITZ, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992, onwards. Version: 1st June 2007. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em 15/05/2010.
- WERKER, E. Function of Essential Oil-Secreting Glandular Hairs in Aromatic Plants of the Lamiaceae. A Review. *Flavour and Fragrance Journal*, n. 8, p. 249-255, 1993.
- WERKER, E. Trichome Diversity and Development. **Advances in Botanical Research**, n. 31, p. 1-35, 2000.
- 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. *Isr. J. Bot.*, n. 34, p.31- 45, 1985a.

WERKER, E.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E. Structure of Glandular Hairs and Their Secretion in the Vegetative and Reproductive Organs of *Salvia Sclarea* And *Salvia Dominica*. Israel Journal of Botany, n. 34, p. 239-252, 1985b.

WUNDRELICH, R. Ein Vorschlag zu einer natüirlichen Gliederung der Labiaten auf Grund der Pollenkorner, der Samenentwicklung und des reifen Samens. Oesterr. Bot. vol. 114, p. 383-483,1967.

Recebido em 11 de março de 2015.

Aprovado em 22 de abril de 2015.