

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**TRICOMAS SECRETORES DE *Lippia stachyoides* Cham.  
(VERBENACEAE): ESTRUTURA, ONTOGÊNESE E SECREÇÃO**

**SHELLY FAVORITO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU - SP**

**- 2009 -**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**TRICOMAS SECRETORES DE *Lippia stachyoides* Cham.  
(VERBENACEAE): ESTRUTURA, ONTOGÊNESE E SECREÇÃO**

**SHELLY FAVORITO**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SILVIA RODRIGUES MACHADO**

**ORIENTADORA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU - SP**

**- 2009 -**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Favorito, Shelly.

Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cha. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção / Shelly Favorito– Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Silvia Rodrigues Machado

Assunto CAPES: 20302002

1. Morfologia vegetal 2. Alecrim - Uso terapêutico 3. Plantas medicinais

CDD 581.634

Palavras-chave: Anatomia; Cerrado; *Lippia stachyoides*; Tricomas secretores; Verbenaceae

*Aos meus pais, Nestor e Maria, minhas irmãs, Sandra e Sheila,  
meus cunhados, Guto e Paulo, meus sobrinhos, Mariana, Bruno,  
Lucas e Raphael e ao meu marido, Márcio, que compartilharam  
meu sonho e ideal, o meu profundo agradecimento pela grandeza  
com que souberam estar presentes.*

## *Agradecimentos*

À **Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado**, pela orientação e pelo seu exemplo de profissionalismo, amor e dedicação ao trabalho; pela convivência harmoniosa e agradável, por ter me ensinado muito do que sei.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa concedida (MS 06/58170-5).

A todos os **funcionários, alunos e professores do Departamento de Botânica**, que se mostraram prontos a ajudar sempre que precisei.

À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica**, IBB, UNESP, pela assistência no processamento das amostras.

Aos **funcionários da Biblioteca Central da UNESP**, Campus de Botucatu, pela edição da ficha catalográfica.

À **Elza, Natália, Thunder e Coró**, pela convivência e amizade.

À **Yve e Ju Stahl**, pelo companheirismo e boas risadas dadas nestes anos.

À **Clívia**, pelo apoio nos momentos de fraqueza, por me incentivar a nunca desistir e me mostrar que sou capaz, enfim, pela demonstração de amizade.

À **Tati**, amiga de todas as horas, pelas muitas vezes que me levou ao campo, pelos almoços na sala 1, pelos conselhos, por estar sempre aberta pra me ouvir, enfim, por todos os momentos compartilhados. Obrigada por tudo.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho.

## Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Revisão Bibliográfica.....	7
Apresentação do capítulo.....	19
Artigo.....	20
Resumo.....	20
Introdução.....	22
Material e métodos.....	24
Resultados.....	26
Discussão.....	34
Referências Bibliográficas.....	40
Tabelas.....	49
Legenda das figuras.....	51
Ilustrações.....	58
Considerações finais.....	71
Referências Bibliográficas.....	72

FAVORITO, S. **TRICOMAS SECRETORES DE *Lippia stachyoides* CHAM. (VERBENACEAE): ESTRUTURA, ONTOGÊNESE E SECREÇÃO.** 2009. 83p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo** - Uma característica da família Verbenaceae é a presença de tricomas secretores, geralmente produtores de óleos essenciais de grande valor medicinal. Muitas espécies de *Lippia* Houtt. são utilizadas em programas fitoterápicos e de complementação alimentar no Brasil, sendo *L. alba* e *L. sidoides* as mais utilizadas e estudadas. O cerrado possui aproximadamente 33 espécies de *Lippia* cujo potencial farmacológico é desconhecido. Apesar da importância econômica como fonte de medicamentos e da representatividade de *Lippia* na flora aromática nativa, pouco se conhece sobre os aspectos estruturais e da secreção dos seus tricomas secretores. Neste trabalho foram estudados os tricomas secretores presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos de *L. stachyoides* Cham. sob o ponto de vista morfológico, ontogenético, histoquímico e ultra-estrutural. Foram utilizadas técnicas convencionais em estudos anatômicos e ultra-estruturais; a identificação *in situ* da composição química das substâncias presentes nos tricomas foi realizada por meio de testes histoquímicos. Em *L. stachyoides*, os tricomas secretores são capitados e foram classificados em cinco tipos morfológicos, os quais são amplamente distribuídos no caule, folhas e inflorescências. A histoquímica revelou que nos tipos I e IV predominam substâncias hidrofílicas e nos tipos II e V, substâncias lipofílicas. De um modo geral, as características ultra-estruturais observadas em cada tipo de tricoma corroboraram os resultados das análises histoquímicas. Os resultados do presente trabalho sugerem que as variações morfológicas dos tricomas secretores em *L. stachyoides* estão associadas com a composição química da secreção.

**Palavras-chave:** anatomia, cerrado, *Lippia stachyoides*, tricomas secretores, ultra-estrutura, Verbenaceae.

FAVORITO, S. **SECRETORY TRICHOMES OF *Lippia stachyoides* CHAM. (VERBENACEAE): STRUCTURE, ONTOGENESIS AND SECRETION.** 2009. 83p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Abstract** – A feature of the family Verbenaceae is the presence of secretory trichomes, producers of essential oils with great medicinal value. Many species of *Lippia* Houtt. are employed in phytotherapeutic and food complementation programs in Brazil, being *L. alba* and *L. sidoides* the most employed and studied species. The Brazilian cerrado has approximately 33 species of *Lippia*, whose pharmacological potential is unknown. Despite the economic importance of *Lippia* as a source of medicinal drugs and its representation in native aromatic flora, little is known about the structural and secretion features of its trichomes. In this work, the secretory trichomes, occurring in vegetative and reproductive organs of *Lippia stachyoides* Cham., were studied on the morphological, ontogenetic, histochemical and ultrastructural views. Usual techniques of vegetal anatomy and ultrastructure were employed; *in situ* identification of the chemical composition of the substances present in the trichomes was performed according to histochemical tests. In *L. stachyoides*, the secretory trichomes are capitate and classified according to five morphological types which are widely distributed in the shoot, leaves and inflorescences. The histochemistry revealed that in types I and IV, hydrophilic compounds are predominant and that lipophilic substances predominate in the types II and V. In general, the ultrastructural features observed in each trichome type corroborate the histochemical analysis. The results of this work suggest that morphological variations of secretory trichomes in *L. stachyoides* are associated to the chemical composition of the secretion.

**Kew words:** anatomy, cerrado, *Lippia stachyoides*, secretory trichomes, ultrastructure, Verbenaceae.



## Introdução

Verbenaceae é uma família botânica que compreende 36 gêneros e 1000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo ervas ou arbustos e menos freqüentemente árvores ou lianas. Nesta família estão incluídas espécies aromáticas e/ou medicinais amplamente usadas na medicina popular (Souza e Lorenzi, 2005).

Muitas espécies de Verbenaceae possuem óleos essenciais produzidos em tricomas secretores. Estudos indicam que esses óleos, ricos em mono e sesquiterpenos, possuem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica (Moldenke, 1965; Dwivedi e Kishore, 1990; Kishore e Mishra, 1991; Kishore *et al.*, 1993; Bonzani *et al.*, 1997; Nunes *et al.*, 2000; Hassan e Begum, 2001; Zoghbi *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Viljoen *et al.*, 2004).

Entre as Verbenaceae com reconhecido valor medicinal destacam-se as espécies pertencentes a *Lippia* Houst., um gênero nativo distribuído principalmente nos neotrópicos (Leal *et al.*, 2003). Muitas dessas espécies são de ocorrência restrita em áreas de cerrados e montanhas altas do Brasil e Bolívia. No Brasil, os principais centros de diversidade específica deste gênero estão localizados na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Chapada Diamantina, na Bahia, sendo a morfologia da inflorescência o principal caráter utilizado em diferentes sistemas para delimitação de táxons infragenéricos (Salimena, 2002).

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *L. sidoides* Cham. são as espécies mais conhecidas e extensivamente estudadas sob o ponto de vista químico e agrônômico (Leal *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2004; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005). O valor medicinal do óleo essencial tem sido ressaltado nos numerosos trabalhos que abordam sua composição química (Dwivedi e Kishore, 1990; Kishore e Mishra,

1991; Kishore *et al.*, 1993; Zoghbi *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Viljoen *et al.*, 2004).

*L. alba* é uma espécie originária da América do sul, sendo conhecida por erva cidreira brasileira ou falsa melissa. É amplamente usada em substituição à *Melissa officinalis* na forma de chás, macerados, compressas, banhos e extratos alcoólicos (Julião *et al.*, 2001 in Biasi e Costa, 2003). Suas folhas são utilizadas em forma de infusão pelas atividades antiespasmódica, estomáquica, carminativa, relaxante do sistema nervoso (Albuquerque, 1989; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005), emenagoga (Corrêa, 1984) e contra intoxicações em geral (Di Stasi *et al.*, 1989). A ação antifúngica (Kishore e Mishra, 1991; Kishore *et al.*, 1993; Duarte *et al.*, 2005), bactericida (Caceres *et al.*, 1991) e analgésica foi comprovada nesses estudos. Os principais constituintes do óleo essencial de *L. alba* são o alfa-terpineno, beta-cariofileno e citral (Gomes *et al.*, 1993; Corrêa, 1992; Silva, 1979; Craveiro, 1981a,1987).

Estudos químicos revelaram variações na produção e na composição do óleo essencial de *L. alba* que se devem, provavelmente, aos efeitos dos fatores ambientais e à metodologia empregada pelos diferentes pesquisadores, bem como a variabilidade genética dessa espécie (Ming, 1992; Santos *et al.*, 2004). Camargo (2001) verificou que plantas de *L. alba* constituem uma importante fonte de néctar para abelhas e comprovou que o mel desta espécie em concentrações elevadas apresentou ação antibacteriana; as análises feitas pelo autor indicaram que as características físico-químicas deste mel atendem aos padrões da legislação brasileira, para todos os aspectos analisados.

*L. sidoides* Cham. popularmente conhecida como alecrim-pimenta, tem sido usada na complementação alimentar como fonte de vitaminas para a população carente em projetos de fitoterapia e medicina social em vários municípios brasileiros (Mattos *et al.*, 1996; Ming, 1992). O extrato aquoso de *L. sidoides* é dotado de acentuado efeito anti-

séptico, antiinflamatório e cicatrizante (Pascual *et al.*, 2001). Seu óleo essencial tem como principal constituinte o timol (Leal *et al.*, 2003).

No gênero *Lippia*, a produção de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas secretores (Bonzani *et al.*, 1997; Nunes *et al.*, 2000; Hassan e Begum, 2001).

Estudos morfológicos incluindo análises ontogenéticas, estruturais e histoquímicas desses tricomas em representantes de *Lippia* são raros. Bonzani *et al.* (2003) estudaram o indumento de três espécies de *Lippia* (*L. turbinata* Griseb, *L. junelliana* (Mold.) e *L. integrifolia* (Griseb.)) e relataram variações no número de células da cabeça dos tricomas capitados, sendo descritos tricomas com cabeça unicelular, cabeça tetracelular e cabeça multicelular. Santos *et al.* (2004) descreveram três tipos de tricomas secretores para *L. alba*. Combrinck *et al.* (2007) analisaram a morfologia e a histoquímica dos tricomas secretores de *Lippia scaberrima*, uma espécie do sul da África, amplamente utilizada na medicina popular, e encontraram quatro tipos morfológicos de tricomas secretores.

Em *Lippia* a morfologia, distribuição e frequência dos tricomas, secretores e não secretores podem ser usados como caracteres taxonômicos discriminativos em nível específico (Salimena, 2002). Além disso, estudos anatômicos detalhados do indumento podem contribuir para o controle de qualidade de drogas, considerando-se a ampla utilização dessas plantas na medicina popular (Bonzani *et al.*, 2003).

Com base na literatura disponível, pode-se concluir que os tricomas secretores em representantes de *Lippia* carecem de estudos principalmente quanto à distribuição, caracterização morfológica e histoquímica, bem como quanto aos aspectos celulares relacionados com a secreção.

Apesar da importância econômica dessas plantas como fonte de medicamentos e da representatividade de *Lippia* na flora do cerrado, com aproximadamente 33 espécies

catalogadas (Sano e Almeida, 1998), os estudos são ainda muito escassos. Estudos desta natureza, além de reforçar a importância da conservação da biodiversidade, poderão subsidiar programas de manejo e uso racional da flora aromática e medicinal do cerrado.

Assim, visando complementar e ampliar as informações sobre os tricomas secretores em representantes de Verbenaceae, este trabalho propôs o estudo da morfologia, ontogênese, histoquímica e ultra-estrutura dos tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham., espécie subarborescente comum em fisionomia campestre de cerrado.

## Revisão Bibliográfica

### A família Verbenaceae

Verbenaceae juntamente com outras 20 famílias do grupo das asterídeas constituem a ordem Lamiales (Judd, 1999; Souza e Lorenzi, 2005). Nesta ordem estão incluídas importantes plantas aromáticas como lavândula, jasmim, menta, basílico, alecrim, verbena entre outras.

Verbenaceae possui 36 gêneros e 1000 espécies com distribuição pan-tropical, principalmente nos neotrópicos. No Brasil, ocorrem 17 gêneros e cerca de 250 espécies, sendo 33 delas ocorrentes no cerrado. As espécies desta família possuem diversos hábitos, variando de arbustos, ervas até, menos frequentemente, árvores e lianas (Metcalf e Chalk, 1950; Sano e Almeida, 1998; Judd, 1999; Souza e Lorenzi, 2005).

Dentre as verbenáceas encontram-se espécies ornamentais comumente cultivadas como, por exemplo, *Duranta repens* e *Lantana camara*, espécies invasoras de culturas pertencentes a *Verbena* sp. e *Stachytarpheta* sp. e espécies aromáticas e medicinais como as pertencentes ao gênero *Lippia* (Souza e Lorenzi, 2005).

Os representantes de Verbenaceae apresentam caule quadrangular ou poligonal densamente pubescente com tricomas não secretores e tricomas secretores. As folhas são opostas, raramente verticiladas; anfiestomáticas ou hipoestomáticas, simples com margem serreada, às vezes lobada. Não possuem estípulas e algumas espécies apresentam nectários extraflorais. O limbo pode variar de dorsiventral a isobilateral. As folhas, assim como o caule, são densamente pubescentes. As flores são pouco vistosas e estão reunidas em cachos terminais ou axilares. São bissexuais, zigomorfas e diclamídeas. O cálice é tubular, pentâmero e gamossépalo e a corola pentâmera, gamopétala e bilabiada. Apresentam estames didínamos adnados à corola e ovário súpero bicarpelar. Os frutos da maioria das espécies são drupáceos, sendo que apenas

nas espécies de *Verbena* estes são esquizocarpos (Metcalf e Chalk, 1950; Judd, 1999; Souza e Lorenzi, 2005).

A presença de tricomas secretores é uma característica marcante em Verbenaceae e segundo Metcalfe e Chalk (1950), estes tricomas são de dois tipos: capitados com cabeça pequena composta de uma ou um pequeno número de células e pedicelo com comprimento variável; e tricomas peltados com haste curta e cabeça multicelular em forma de disco.

### **O gênero *Lippia***

*Lippia* Houst., primeiramente descrito em 1753 por Linnaeu, é um gênero nativo de Verbenaceae que inclui ervas, arbustos e pequenas árvores. Possui cerca de 200 espécies, a maioria concentrada no Brasil, Paraguai e Argentina, havendo poucas espécies endêmicas da África. No Brasil, ocorrem cerca de 150 espécies distribuídas em áreas de cerrados, e montanhas altas e campos rupestres de Minas Gerais e Bahia (Pascual *et al.*, 2001; Salimena, 2002; Leal *et al.*, 2003; Pimenta *et al.*, 2007).

Muitas espécies deste gênero são utilizadas em programas fitoterápicos e de complementação alimentar no Brasil, sendo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *L. sidoides* Cham. as espécies mais conhecidas e estudadas sob o ponto de vista químico e agrônomo (Pascual *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005).

*L. alba*, conhecida popularmente como erva cidreira brasileira ou falsa melissa, é consumida na forma de chás como digestiva, macerada para dores de dente e na forma de banhos como febrífuga. As atividades antifúngica, bactericida e analgésica dos óleos produzidos por esta espécie foram comprovadas com testes farmacológicos. (Pascual *et al.*, 2001; Aguiar e Costa, 2005).

*L. sidoides*, conhecida popularmente como alecrim pimenta, tem sido usada na complementação alimentar como fonte de vitaminas para a população carente em projetos de fitoterapia e medicina social em vários municípios brasileiros. Seu óleo essencial é amplamente usado como anti-séptico (Pascual *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007).

As propriedades medicinais atribuídas a espécies de *Lippia* estão relacionadas à produção de óleos essenciais pelos tricomas secretores. Em *Lippia*, a morfologia, distribuição e frequência dos tricomas secretores e não secretores podem ser usados como caracteres taxonômicos discriminativos em nível específico (Bonzani *et al.*, 1997; Salimena, 2002).

Inúmeros trabalhos sobre a análise química dos óleos essenciais de Verbenaceae mostraram que terpenóides são os compostos mais comuns e estruturalmente diversos presentes na secreção dos tricomas secretores (Uphof, 1962; Levin, 1973; Croteau *et al.*, 2000; Peres, 2004; Santos *et al.*, 2004; Aguiar e Costa, 2005; Combrinck *et al.*, 2007; Mevy *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

### **Tricomas**

O termo tricoma significa conjunto de pêlos (*trichos*, pêlo e oma massa ou conjunto), pois era utilizado para designar o que hoje se considera como indumento. Hoje, o termo tricoma é utilizado para designar a unidade que compõe o indumento (Gonçalves e Lorenzi, 2007).

Segundo Gonçalves e Lorenzi (2007), tricoma é uma célula ou um conjunto de células diferenciadas da epiderme que usualmente projetam-se, como se fossem pêlos. São apêndices de origem epidérmica que apresentam diversas formas, estruturas e funções podendo ser classificados de diversas formas (Behnke, 1984; Wagner, 1991).

Muitos autores têm utilizado uma mistura de caracteres morfológicos e anatômicos para classificá-los. Segundo Behnke (1984), os tricomas podem ser classificados em unicelulares ou pluricelulares, simples ou compostos, secretores ou não secretores.

Tricomas unicelulares são aqueles formados por uma única célula enquanto que tricomas multicelulares são formados por mais de uma célula. Estes últimos podem ser de dois tipos: unisseriados quando as células que o compõem estão dispostas em uma única fileira ou multisseriados, quando as células se dispõem em mais de uma fileira de células. Tricomas simples (ou não ramificados) são aqueles que não possuem ramificação no ápice, já os tricomas compostos (ou ramificados) apresentam ramificação no seu ápice. Tricomas não secretores ou de cobertura não produzem secreção, enquanto que tricomas secretores produzem e secretam, para o meio externo, determinadas substâncias (Behnke, 1984).

Segundo Fahn (1988), o fim do século XIX e início do século XX foi um período de grande interesse nas pesquisas de tecidos secretores com numerosas publicações em anatomia e morfologia; secreção de produtos naturais; fisiologia e ecologia. Segundo o autor, durante o curso evolutivo, as primeiras estruturas envolvidas em processo de secreção eram idioblastos ou grupos de células pouco especializadas. Posteriormente, surgiram estruturas internas mais especializadas representadas por canais e cavidades secretoras e os tricomas secretores, segundo o autor, são as estruturas mais recentemente evoluídas envolvidas em processo de secreção e interações com o meio.

Tricomas secretores são formados por uma porção que se insere entre as outras células epidérmicas, chamada de base, e um segmento que se encontra acima da superfície da epiderme, chamado de corpo. O corpo do tricoma é representado por um pedicelo, que é a porção que eleva as células secretoras (pode ou não estar presente), podendo ser formado por uma a muitas células; uma célula colar que conecta a cabeça



com o pedicelo (pode ou não estar presente); e uma cabeça, que é a porção apical secretora (Fahn, 1979; Gonzales e Arbo, 2004).

Os tricomas secretores podem ser classificados em dois tipos: capitados e peltados. Tricomas capitados possuem um pedicelo de comprimento variado, composto de número diverso de células e cabeça secretora globosa com até quatro células, enquanto que tricomas peltados são formados por pedicelo curto semelhante à base, cabeça ampla achatada formada por mais de quatro células arranjadas em disco (Payne, 1978; Fahn, 1988; Ascensão *et al.*, 1995).

O desenvolvimento dos tricomas secretores se inicia logo nos primeiros estágios de desenvolvimento do órgão no qual está inserido, no qual uma célula protodérmica que se apresenta maior que as adjacentes, passa por uma série de divisões periclinais dando origem a uma fileira unisseriada de células. Se o tricoma originado for multisseriado, esta fileira de células irá sofrer divisões anticlinais. Esta fileira de células, uni ou multisseriada, dará origem às células que comporão base, pedicelo, célula colar (quando presentes) e célula inicial da cabeça secretora. A célula inicial da cabeça secretora sofre um alargamento e pode ainda sofrer divisões anticlinais, quando a cabeça for multicelular.

Segundo Uphof (1962), os tricomas secretores secretam uma variedade de substâncias do metabolismo secundário, como taninos, mucilagem, substâncias resinosas, óleos essenciais e as características peculiares das células que as produzem variam de acordo com as substâncias produzidas. De uma forma geral, células secretoras especializadas são pequenas, possuem paredes delgadas com plasmodesmos, núcleo relativamente grande, citoplasma denso e abundante, espaço periplasmático e subcuticular desenvolvidos, abundância de mitocôndrias e o tipo de organela predominante está relacionado com o tipo de secreção (Fahn, 1979, 2000; Castro e

Machado, 2006). Tricomas que secretam substâncias predominantemente hidrofílicas possuem dictiossomos hiperativos, enquanto que tricomas que secretam substâncias predominantemente lipofílicas possuem abundante retículo endoplasmático liso e plastídeos polimórficos contendo acúmulo de material osmiofílico (Fahn, 1979).

Mono e sesquiterpenos são os tipos mais comuns de terpenos encontrados nos óleos essenciais. Monoterpenos são formados por 10 carbonos; possuem baixo peso molecular e por isso são altamente voláteis. Dentre os monoterpenos conhecidos estão o citrionelal e o mentol que possuem um odor agradável e os piretróides, muito utilizados como inseticidas. Os sesquiterpenos são formados por 15 carbonos e muitos também são voláteis, podendo fazer parte da composição dos óleos essenciais. Dentre os sesquiterpenos conhecidos estão as lactonas, que conferem gosto amargo em folhas da família Asteraceae e o gossypol que confere resistência a pragas no algodão (Peres, 2004).

A secreção dos tricomas secretores é produzida nas células secretoras da cabeça, sendo que muitos precursores desta provém de células do parênquima, o que segundo Sacchetti *et al.* (1999) é confirmado pela presença de plasmodesmos nas paredes transversais do pedicelo. Além disso, as paredes laterais do mesmo apresentam-se cutinizadas controlando o fluxo via apoplasto. Após a produção, a secreção é eliminada para o espaço periplasmático por meio de plasmodesmos e posteriormente para o espaço subcuticular por meio de poros existentes na parede e/ou via plasmodesmos. A cutícula se destaca, formando um amplo espaço subcuticular, no qual a secreção é acumulada. Na maioria das espécies, para a eliminação da secreção, ocorre a ruptura da cutícula em uma linha pré-determinada geneticamente. Em alguns casos, esta linha não existe e a secreção é eliminada por meio de poros existentes na cutícula (Fahn, 1979, 1988).

Segundo Wagner *et al.* (2004), recentemente pesquisadores têm focado suas pesquisas sobre os tricomas secretores buscando entender e explorar a habilidade dessas estruturas para secretar compostos químicos. Além da importância econômica, podendo ser utilizados com diversos propósitos, especialmente como fármacos, pesticidas naturais, aromatizantes, fragrâncias e alimentícios (Bonzani *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2001; Aguiar e Costa, 2005; Oliveira *et al.*, 2007; Mevy *et al.*, 2007), os tricomas secretores são muito importantes ecologicamente participando na regulação de temperatura, aumento da reflexão de luz, diminuição da perda de água, secreção de íons e poluentes, redução na movimentação de insetos na planta, proteção contra fungos e bactérias, atração de polinizadores e efeitos alelopáticos (Levin, 1973; Wagner, 1991; Duke, 1994; Wagner *et al.*, 2004).

#### **Tricomas secretores em Lamiaceae**

Trabalhos que se referem à morfologia, estrutura, ontogênese e ultra-estrutura dos tricomas secretores de Verbenaceae são raros, no entanto muitos estudos têm sido realizados para Lamiales em especial para os representantes de Lamiaceae (Werker *et al.*, 1985; Maffei *et al.*, 1989; Doaigey, 1991; Werker *et al.*, 1993; Bourett *et al.*, 1994; Ascensão *et al.*, 1995; Antunes *et al.*, 1997; Serratto-Valenti *et al.*, 1997; Ascensão e Pais, 1998; Bisio *et al.*, 1999; Ascensão *et al.*, 1999; Navarro e Qualidi, 2000; Turner *et al.*, 2000; Gersbach, 2002; Sharma *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004; Martins e Pastori, 2004; Marin *et al.*, 2006; Krstic *et al.*, 2006; Kamatou *et al.*, 2007; Grubestic *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2007). A seguir são comentados alguns trabalhos considerados de maior relevância no contexto desta pesquisa.

Werker *et al.* (1993) analisaram os tricomas secretores e sua distribuição nos diferentes estágios de desenvolvimento das folhas e a composição do óleo essencial de

*Ocimum basilicum*. Foram observados tricomas secretores peltados e capitados. Segundo os autores, nos tricomas secretores peltados a secreção é acumulada no espaço subcuticular formado entre a parede das células da cabeça e a cutícula, enquanto que nos tricomas secretores capitados este espaço é reduzido ou inexistente. Através dos testes histoquímicos foram detectadas substâncias lipídicas e polissacarídeos no material acumulado no espaço subcuticular. Os autores verificaram que a densidade de tricomas foi maior em folhas jovens e em regiões meristemáticas. Na medida em que a folha se expande, a densidade de tricomas decresce, pois novos tricomas param de ser produzidos.

Bourett *et al.* (1994) descreveram a ultra-estrutura, a morfologia e o desenvolvimento dos tricomas de *Nepeta racemosa*. Os autores observaram dois tipos de tricomas secretores: capitados com cabeça bicelular e peltados com cabeça 4-celular. Segundo as observações feitas pelos autores, as células secretoras dos tricomas capitados exibiram uma morfologia típica de célula de transferência com invaginações do plasmalema e apresentaram abundante retículo endoplasmático e vesículas do Golgi, indicando secreção de substâncias hidrofílicas, enquanto que os tricomas peltados apresentaram a cutícula distendida e um grande espaço subcuticular, presumivelmente contendo óleos essenciais. Foram descritos quatro estágios de desenvolvimento das células secretoras dos tricomas peltados. O primeiro estágio se caracterizou pela presença de muitos vacúolos. No segundo, houve uma redução no número e tamanho dos vacúolos e um aumento no sistema de endomembranas na proximidade dos plastídeos com pequena diferenciação interna. Neste estágio, ocorreu acúmulo de material no espaço subcuticular. A retração das paredes das células e uma aparência fina do plasmalema caracterizaram o terceiro estágio. O quarto estágio foi descrito pelos autores como sendo o estágio no qual o tricoma está maduro. Neste estágio, um amplo

espaço subcuticular foi formado, ocorrendo uma exagerada retração do plasmalema e as mitocôndrias aparecem na periferia da célula.

Ascensão *et al.* (1995) descreveram para órgãos vegetativos e reprodutivos de *Leonotis leonurus* tricomas peltados e capitados, sendo que nas folhas foram observados os dois tipos em abundância enquanto que nas flores os peltados foram numerosos e os capitados foram raros ou ausentes. Os autores relataram que os tricomas capitados se originaram de células protodérmicas maiores que as adjacentes. Através de uma série de divisões periclinais, foi formada uma fileira de três a cinco células que correspondiam à célula basal, células do pedicelo e célula inicial da cabeça secretora. Em seguida, a célula inicial da cabeça secretora se alargou formando uma célula globosa. Finalmente, através de duas sucessivas divisões anticlinais, foi formada a cabeça secretora 4-celular. Já os tricomas peltados, se originaram de uma célula protodérmica que sofreu uma divisão periclinal originando células do pedicelo e célula inicial da cabeça secretora. Esta célula passou por um período de alargamento e divisões anticlinais que deram origem à cabeça secretora. Ascensão *et al.* (1995) sugeriram que a secreção produzida nos tricomas peltados fica retida no espaço subcuticular formado pela separação da cutícula juntamente com a camada de pectina da parede da célula até que ocorra o rompimento e a liberação da secreção. Nos tricomas capitados, a secreção se acumulou num pequeno espaço subcuticular e foi liberada por meio de microporos.

Ascensão e Pais (1998) investigaram a histoquímica, a ultra-estrutura e a secreção dos tricomas capitados de *Leonotis leonurus*. Segundo os autores, os tricomas consistiam de cabeça globular com quatro células e pedicelo de tamanho e morfologia variável e foram divididos em dois tipos: tipo I, com pedicelo curto e cilíndrico e tipo II, com pedicelo longo e cônico, suportado por um pedestal celular. De acordo com testes histoquímicos, a secreção destes tricomas seria composta de polissacarídeos, proteínas,

óleos essenciais e flavonóides. Os autores relataram que durante a fase secretora as células da cabeça dos tricomas apresentaram retículo endoplasmático bem desenvolvido e numerosas vesículas do complexo de Golgi em atividade, características que não condizem com as de células em atividade secretora de terpenóides. Os autores sugeriram, então, que os componentes protéicos e polissacarídeos seriam transportados até a membrana plasmática via vesículas do Golgi, enquanto que os constituintes lipídicos seriam transportados diretamente pelo retículo endoplasmático. A secreção foi acumulada no espaço subcuticular e a ausência da ruptura da cutícula sugeriu a ocorrência de microporos.

Marin *et al.* (2006) analisaram os tricomas secretores de folhas de *Rosmarinus officinalis* sob o ponto de vista morfológico, estereológico e histoquímico. Os autores descreveram tricomas peltados com uma célula epidérmica basal, um pedicelo unicelular e uma cabeça secretora multicelular; e tricomas capitados de dois tipos: o tipo I consistiu de uma célula basal, um curto pedicelo unicelular e uma cabeça secretora com uma ou duas células, já o tipo II foi descrito com uma célula basal, um pedicelo curto uni ou bicelular e cabeça secretora unicelular. Os resultados mostraram que o volume dos tricomas peltados foi maior que o dos tricomas capitados, embora estes últimos se apresentassem mais numerosos. Os testes histoquímicos mostraram reações positivas para proteínas e polissacarídeos em ambos os tipos de tricomas, enquanto que compostos fenólicos foram verificados apenas nos tricomas peltados.

### **Tricomas secretores em Verbenaceae**

Na literatura disponível, foram encontrados apenas quatro trabalhos sobre tricomas secretores de Verbenaceae, sendo que três destes não se referem especificamente aos

tricomas, descrevendo sucintamente sua morfologia e secreção. Apenas em um dos trabalhos os tricomas são tratados como tema central.

Inamdar (1969) estudou a estrutura epidérmica com ênfase na ontogênese dos estômatos e descreveu brevemente três tipos de tricomas secretores: 1) capitado de pedicelo curto; 2) tricoma secretor peltado e 3) tricoma secretor peltado filiforme composto de pé, pedicelo unisseriado filiforme com quatro a seis células e cabeça secretora com quatro a oito células de 14 espécies de Verbenaceae, não sendo incluída nenhuma espécie de *Lippia*.

Bonzani *et al.* (2003) estudaram a anatomia do caule de sete espécies de Verbenaceae incluindo três espécies de *Lippia* (*Lippia integrifolia*, *L. turbinata* e *L. junelliana*) e descreveram brevemente os tricomas secretores presentes nas espécies estudadas. As três espécies de *Lippia* apresentaram tricomas secretores curtos compostos de pedicelo com duas células isodiamétricas e cabeça com 1-4 células e apenas *L. junelliana* apresentou tricomas largos composto de pedicelo bicelular com a célula proximal dilatada radialmente e cabeça pluricelular.

Santos *et al.* (2004) caracterizaram anatomicamente as estruturas secretoras de *Lippia alba* e avaliaram o efeito dos diferentes horários de colheita na composição de seu óleo essencial e a quantidade deste nas estações seca e chuvosa. Os autores observaram três tipos de tricomas secretores de substâncias lipídicas (evidenciadas com Sudan IV): o primeiro apresentou uma célula basal, um pedicelo alongado bicelular e uma porção capitada bicelular; o segundo apresentou uma célula basal, uma célula intermediária e uma porção capitada bicelular e o terceiro tipo, uma célula basal estreita e uma porção capitada globosa. Os resultados de Santos *et al.* mostraram que a obtenção de óleo essencial na estação seca foi superior à chuvosa e que as substâncias que compõem o óleo essencial variaram de acordo com as variações ambientais.

Combrinck *et al.* (2007) estudaram a morfologia e a histoquímica dos tricomas secretores de *Lippia scaberrima*, originária da África do Sul. Neste trabalho foram descritos três tipos de tricomas secretores que diferiram na morfologia e no material secretado: tricomas secretores peltados bulbosos, tricomas secretores capitados bulbosos e setas. Tricomas secretores peltados bulbosos apresentaram cabeça composta de uma célula, não apresentaram pedicelo e separavam-se da epiderme por um estreitamento da célula basal. Segundo os autores, estes foram os sítios de acúmulo dos óleos essenciais, uma vez que a presença de terpenóides foi verificada por meio de microscopia de fluorescência. Tricomas secretores capitados bulbosos apresentaram-se multicelulares e constituídos de um pedicelo unicelular e cabeça secretora composta de 1-4 células. Produziam, provavelmente, compostos fenólicos detectados com o uso de microscopia de Fluorescência. Setas são tricomas finos e cônicos com a superfície ornamentada e base unisseriada. Inicialmente os autores acreditavam que este tipo se tratava de tricoma não secretor, porém, após análises em microscopia de fluorescência, verificou-se que são estruturas de estocagem de metabólitos secundários. Verificou-se que todos os tipos estão distribuídos nas faces abaxial e adaxial das folhas, cálice e pétalas. Este estudo é o mais complexo e contribui para o conhecimento morfológico, do desenvolvimento e do conteúdo do óleo essencial dos tricomas secretores em *Lippia*, uma vez que são poucos e fragmentados os estudos com esse gênero.

Com base na revisão da bibliografia disponível, pode-se concluir que os tricomas secretores em representantes de *Lippia* carecem de estudos principalmente quanto à distribuição, diversidade morfológica e histoquímica, bem como quanto aos aspectos celulares relacionados com a secreção.



Conforme estabelecido pelo Conselho da Área de Botânica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Mestrado foram reunidos em um artigo científico para publicação, apresentado de acordo com as normas do periódico *Plant Biology*.

**Artigo:** Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae):

estrutura, ontogênese e secreção

**Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura,  
ontogênese e secreção**

**Resumo:** Uma característica da família Verbenaceae é a presença de tricomas secretores, geralmente produtores de óleos essenciais de grande valor medicinal. Muitas espécies de *Lippia* Houst. são utilizadas em programas fitoterápicos e de complementação alimentar no Brasil, sendo *L. alba* e *L. sidoides* as mais utilizadas e estudadas. O cerrado possui aproximadamente 33 espécies de *Lippia* cujo potencial farmacológico é desconhecido. Apesar da importância econômica como fonte de medicamentos e da representatividade de *Lippia* na flora aromática nativa, pouco se conhece sobre os aspectos estruturais e da secreção dos seus tricomas secretores. Neste trabalho foram estudados os tricomas secretores presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos de *L. stachyoides* Cham. sob o ponto de vista morfológico, ontogenético, histoquímico e ultra-estrutural. Foram utilizadas técnicas convencionais em estudos anatômicos e ultra-estruturais; a identificação *in situ* da composição química das substâncias presentes nos tricomas foi realizada por meio de testes histoquímicos. Em *L. stachyoides*, os tricomas secretores são capitados e foram classificados em cinco tipos morfológicos, os quais são amplamente distribuídos no caule, folhas e inflorescências. A histoquímica revelou que nos Tipos I e IV predominam substâncias hidrofílicas e nos Tipos II e V, substâncias lipofílicas. De um modo geral, as características ultra-estruturais observadas em cada tipo de tricoma corroboraram os resultados das análises histoquímicas. Os resultados do presente trabalho mostraram diversidade morfológica, histoquímica e ultra-estrutural de tricomas secretores em *L. stachyoides* e muito provavelmente esta diversidade está associada com a composição química da secreção.

**Palavras-chave:** anatomia, cerrado, *Lippia stachyoides*, tricomas secretores, ultra-estrutura, Verbenaceae.

**Abreviaturas**

CB: célula basal

CC: célula colar

CS: cabeça secretora

CT: cutícula  
DI: dictiosomos  
EP: espaço periplasmático  
ES: espaço subcuticular  
LI: lipídeos  
MI: mitocôndrias  
NU: núcleo  
PL: plastídeos  
PC: parede celular  
PE: pedicelo  
PR: poliribossomos  
RE: retículo endoplasmático  
REL: retículo endoplasmático liso  
RER: retículo endoplasmático rugoso  
TS: tricoma secretor  
VA: vacúolo  
ZIO: *Zinc iodide-osmium tetroxide*

## Introdução

Verbenaceae é uma eudicotiledônea constituída por 36 gêneros e cerca de 1000 espécies com distribuição pan-tropical, principalmente nos neotrópicos. Inclui arbustos, ervas até, menos frequentemente, árvores e lianas. Nesta família estão incluídas espécies aromáticas e/ou medicinais amplamente usadas na medicina popular (Souza e Lorenzi 2005).

*Lippia* Houst., um dos gêneros mais numerosos de Verbenaceae, possui cerca de 200 espécies, a maioria delas concentrada no Brasil, Paraguai e Argentina com poucas espécies endêmicas da África. No Brasil, este gênero está representado por cerca de 150 espécies distribuídas em diferentes formações vegetais incluindo cerrado, e principalmente montanhas altas e campos rupestres de Minas Gerais e Bahia (Pascual *et al.*, 2001; Salimena, 2002; Leal *et al.*, 2003; Pimenta *et al.*, 2007).

Muitas espécies de *Lippia* possuem propriedades medicinais e são utilizadas em programas fitoterápicos e de complementação alimentar em diversas localidades do Brasil. As propriedades medicinais atribuídas a essas plantas têm sido associadas com a presença de óleos essenciais produzidos por tricomas secretores peltados e capitados, como verificado por diferentes autores (Bonzani *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Combrinck *et al.*, 2007). Os óleos essenciais de *Lippia* são ricos em mono e sesquiterpenos e suas atividades antifúngica, bactericida e analgésica foram experimentalmente comprovadas (Moldenke, 1965; Dwivedi e Kishore, 1990; Kishore e Mishra, 1991; Kishore *et al.*, 1993; Bonzani *et al.*, 1997; Nunes *et al.*, 2000; Hassan e Begum, 2001; Zoghbi *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Viljoen *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2001; Aguiar e Costa, 2005).

Apesar da importância econômica dos representantes de *Lippia* na flora aromática e medicinal e de seu potencial como fonte de medicamentos, usos em perfumaria e cosméticos e na produção de repelentes naturais, somente um número pequeno de espécies brasileiras tem sido investigado sendo *L. alba* (erva cidreira brasileira ou falsa melissa) e *L. sidoides* (alecrim-pimenta) as espécies mais intensamente estudadas, principalmente sob o ponto de vista químico e agrônomo (Leal *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2004; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2005). Com relação aos tricomas secretores, os estudos são restritos a poucas espécies deste gênero e, de um modo geral, as informações se referem a caracterização morfológica dos tricomas em órgãos adultos (Bonzani *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Combrinck *et al.*, 2007). Para as espécies nativas do cerrado, não foram encontrados estudos relacionados aos tricomas e suas secreções.

Estudos detalhados dos tricomas glandulares têm contribuído na interpretação de suas funções em órgãos vegetativos e reprodutivos em diferentes táxons (Werker *et al.*, 1985; Ascensão *et al.*, 1995; Guignard e Dupont, 2004; Machado *et al.*, 2006), sendo que a morfologia, distribuição e frequência dos tricomas glandulares e de cobertura em *Lippia* podem ser usados como caracteres taxonômicos discriminativos em nível específico (Salimena, 2002). Além disso, estudos anatômicos detalhados do indumento de *Lippia* podem contribuir para o controle de qualidade de drogas, considerando-se a ampla utilização dessas plantas na medicina popular (Bonzani *et al.*, 2003). Finalmente, tais informações são fundamentais para a elaboração de novas abordagens e propostas de estudos sobre as Verbenaceae do cerrado, visando à exploração da habilidade dos tricomas secretores para a produção de substâncias biologicamente ativas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos estruturais, histoquímicos e funcionais dos tricomas secretores presentes em órgãos vegetativos e

reprodutivos de *Lippia stachyoides* Cham., espécie herbácea comum em formações campestres de cerrado, para a qual não existem estudos.

### **Material e métodos**

Amostras de ramos caulinares, folhas e flores em diferentes fases de desenvolvimento de foram coletadas de exemplares de *Lippia stachyoides* Cham. vegetando em fragmentos de cerrado localizados no município de Botucatu (22° 55' S, 48° 30' W), estado de São Paulo, Brasil. Exsicatas foram depositadas no Herbário Irina Delanova Gemtchúnicov (BOTU), do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Para os estudos anatômicos e ontogenéticos, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin). Os blocos obtidos foram seccionados a 4-6 µm de espessura (secções transversais e/ou longitudinais) em micrótomo rotatório manual (Leica RM2045) com navalha de aço do tipo C ou lâminas descartáveis. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al.*, 1964) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine, 1921) pH 4,5 e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética "Entellan". As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX41 e a captura de imagens foi feita com câmera digital Olympus acoplada ao microscópio. Para ilustrar a diversidade morfológica, particularidades estruturais e a ontogênese dos tricomas secretores foram feitos desenhos com o auxílio de microscópio de projeção (Vorschaltgerät HBO 200) e de câmara clara acoplada ao microscópio de luz.

Para identificar e localizar *in situ* as principais classes químicas dos metabólitos presentes nos tricomas secretores e verificar a natureza das paredes celulares, secções de material fresco obtidas com auxílio de lâminas de barbear foram tratadas com Sudan IV para lipídios totais (Jensen, 1962), Reagente de Nadi para óleos essenciais (David e Carde, 1964), solução de cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (Johansen, 1940), Lugol para amido (Johansen, 1940), ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros (McManus, 1948), solução de vermelho de Rutênio 0,02% para pectinas (Johansen, 1940) e reagente de Wagner para alcalóides (Furr e Mahlberg, 1981). As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX41 e a captura de imagens foi feita com câmera digital Olympus acoplada ao microscópio.

Para análises da morfologia do indumento foliar e floral ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras intactas e dissecadas foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série crescente de solução alcoólica, secadas em ponto crítico, metalizadas com ouro (Robards, 1978) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Philips Quanta 200. As imagens foram capturadas com câmera digital acoplada ao MEV.

Para análises convencionais das características celulares dos tricomas secretores ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), amostras de tricomas na fase secretora foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3; pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3; incubadas em acetato de uranila 0,5% em solução aquosa; desidratadas em série crescente de soluções de acetona e incluídas em Araldite. As secções ultrafinas (50nm) foram contrastadas com solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 100, a 80kV. Para a detecção de

proteínas básicas, em nível ultra-estrutural, utilizou-se a técnica da Prata Amoniacal (MacRae e Meetz, 1970); para impregnação de membranas o método ZIO (*Zinc iodide-osmium tetroxide*) (Reinecke e Walther, 1978) e para detecção de lipídeos o método do ósmio-imidazol (Angermüller e Fahimi, 1982).

## Resultados

No local de estudo, *L. stachyoides* é um subarbusto com cerca de 80 cm de altura, com sistema subterrâneo espessado de onde partem vários ramos aéreos formando uma touceira (Fig.1). Os ramos aéreos são eretos a prostrados, com filotaxia alterna nos nós basais tornando-se verticilada em direção ao ápice, onde as folhas são reduzidas (Fig. 2). As folhas e ramos caulinares são densamente pubescentes (Fig. 3). As inflorescências são reunidas em cachos e possuem bractéolas pubescentes que sustentam pequenas flores roxas (Figs. 4,5) com odor característico.

O indumento das folhas, ramos caulinares e flores é formado por tricomas secretores e não-secretores. Neste trabalho serão descritos unicamente os tricomas secretores.

Tricomas secretores ocorrem em ambas as superfícies de folhas jovens e adultas, sendo que na face adaxial ficam concentrados sobre as nervuras impressas (Fig. 6) e na abaxial apresentam distribuição aleatória e são mais abundantes (Fig. 7). Nas brácteas das inflorescências (Fig. 8), os tricomas secretores concentram-se na face adaxial (Fig. 9), enquanto que no cálice, estes estão concentrados na face abaxial das sépalas (Fig. 10). A face abaxial da corola é pubescente apresentando tricomas secretores em toda a sua extensão, sendo que estes são mais abundantes em direção ao ápice da corola tubular (Fig. 11). No androceu, tricomas secretores são observados unicamente nos filetes (Fig. 12). O gineceu não apresenta tricomas secretores.



O indumento glandular de *L. stachyoides* é formado por cinco tipos de tricomas secretores, todos do tipo capitado, aqui denominados Tipos I, II, III, IV e V. Foi observado que todos os tipos se diferenciam precocemente no primórdio foliar, sendo observados, lado a lado, tricomas de tipos diferentes em diferentes fases de desenvolvimento. Os cinco tipos de tricomas ocorrem nas folhas, ramos caulinares, sépalas e pétalas, sendo que nos estames ocorrem unicamente os tricomas do tipo IV.

Neste trabalho, são utilizados os termos: *base* para a porção do tricoma que se insere entre as demais células epidérmicas, *corpo* para o segmento do tricoma que se encontra acima da superfície da epiderme, sendo este dividido em *pedicelo* e porção apical secretora chamada de *cabeça*; *célula colar*, aquela que conecta a cabeça ao pedicelo.

*Tricoma secretor do Tipo I* - composto de uma célula basal, pedicelo curto unicelular, célula colar e cabeça esférica formada por quatro células secretoras recobertas por uma espessa cutícula (Figs. **13, 14**). Este tipo de tricoma origina-se de uma única célula protodérmica arredondada, maior que as adjacentes e que, por meio de uma série de divisões periclinais, forma uma fileira unisseriada composta de três células, sendo uma basal, uma intermediária e uma apical maior e ligeiramente esférica. Posteriormente, a célula intermediária divide-se no plano periclinal e origina duas células de tamanhos distintos, sendo uma delas bem mais estreita e de difícil visualização, que é a célula colar. Simultaneamente, a célula apical se expande tornando-se globosa e por meio de duas divisões anticlinais sucessivas origina a cabeça secretora 4-celular (Figs. **23-26**). Tricomas diferenciados apresentam um pequeno espaço subcuticular formado pela distensão da cutícula unicamente na região central da cabeça secretora. Os testes histoquímicos reagiram positivamente para os polissacarídeos neutros, proteínas, lipídeos totais e substâncias fenólicas (Figs. **45-49**).

Polissacarídeos foram detectados no protoplasto e parede das células da cabeça secretora (Fig. 46); proteínas foram detectadas no protoplasto das células da cabeça secretora e do pedicelo (Fig. 47); lipídeos totais foram observados impregnando as paredes laterais do pedicelo e na forma de pequenas inclusões dispersas na célula colar e cabeça secretora (Fig. 48); substâncias fenólicas foram detectadas na célula basal e células da cabeça secretora (Fig. 49).

Ultra-estruturalmente, as células da cabeça mostram citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo evidente, pequenos e abundantes vacúolos (Fig. 50). Os plastídeos são polimórficos variando de globóides a amebóides, não apresentam membranas internas e contém matriz homogênea com inclusões fortemente elétrondensas (Fig. 51). Mitocôndrias com cristas desenvolvidas (Figs. 51, 53, 54), retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos desenvolvidos são também observados (Figs. 52, 54); os vacúolos são elétron-lucentes e contém material membranoso ou floculado (Figs. 50-54). Imagens sugestivas de fusão de vesículas com a membrana plasmática e conseqüente liberação da secreção no espaço periplasmático são frequentemente observadas (Fig. 52). Na medida em que a secreção progride, este espaço é ampliado gradualmente. Células com espaço periplasmático amplo apresentam também espaço subcuticular desenvolvido, formado pela distensão da espessa cutícula. A secreção acumulada neste espaço é homogênea e possui aspecto floculado (Fig. 53). Não foi observado rompimento da cutícula ou poros cuticulares. O teste do ZIO permitiu visualizar as cisternas dos dictiossomos e vesículas associadas preenchidas com conteúdo fortemente elétron-denso. Chama atenção a presença de inclusões densas, que são os produtos da reação, no interior das extremidades dilatadas do retículo endoplasmático (Fig. 54). A marcação citoquímica de proteínas permitiu visualizar

grânulos densos no citoplasma, no interior do espaço periplasmático e associados à parede das células secretoras (Fig. 55).

*Tricoma secretor do Tipo II* – séssil, composto de uma célula basal, célula colar e cabeça secretora unicelular globóide, recobertas por uma cutícula espessa (Figs. 15-16). Origina-se de uma única célula protodérmica maior que as demais, sendo facilmente reconhecida pelo formato esférico; por meio de uma divisão periclinal, origina uma estrutura bicelular constituída de uma célula basal e outra apical esférica. A célula apical se expande e por meio de uma divisão periclinal assimétrica origina a célula colar. A célula apical continua aumentando de volume tornando-se bastante desenvolvida, constituindo a cabeça secretora unicelular (Figs. 27-30). Neste tipo de tricoma não foi observada distensão da cutícula, a qual se mantém aderida à parede mesmo na fase secretora. Esta célula se caracteriza pela presença de um grande vacúolo central, cujo conteúdo reagiu positivamente aos testes para óleos essenciais (Fig. 57), proteínas (Fig. 58), lipídeos totais (Fig. 59) e alcalóides (Fig. 60). Gotas lipídicas conspícuas foram também detectadas no citoplasma (Fig. 59).

Ultra-estruturalmente, a célula da cabeça secretora apresenta um único vacúolo central e volumoso e citoplasma denso, reduzido, em posição periférica (Fig. 61). As células basal, colar e da cabeça secretora são conectadas por muitos plasmodesmos e apresentam organelas distintas. Na célula da cabeça predominam cisternas de retículo endoplasmático liso, plastídeos com estroma fortemente elétron-denso e dictiossomos (Figs. 62-64), enquanto que na célula colar predominam o retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias volumosas com cristas desenvolvidas (Figs. 62, 63). Espaço periplasmático foi observado unicamente no pólo distal da célula colar e no pólo basal

da célula da cabeça secretora (Figs. **63, 65**). O teste do ZIO marcou as membranas e o conteúdo das cisternas dos dictissomos e suas vesículas adjacentes (Fig. **65**).

*Tricoma secretor do Tipo III* - formado por uma célula basal proeminente, pedicelo curto unicelular e cabeça secretora unicelular em forma de ampola recoberta por cutícula espessa (Fig. **17**). O desenvolvimento do tricoma secretor do Tipo III se inicia com o aumento de volume de uma célula protodérmica precursora de formato arredondado. Esta se divide no plano periclinal e origina uma estrutura bicelular constituída de uma célula basal e uma apical esférica. Em seguida, a célula apical se divide periclinamente dando origem a duas células, uma delas constituindo o pedicelo e a outra, a cabeça secretora (Fig. **31-34**). Esta célula se alonga formando uma estrutura em forma de ampola; na fase secretora se caracteriza por apresentar um amplo espaço subcuticular (Fig. **17**). Este tipo de tricoma é bastante escasso, não sendo possível obter amostras para a sua caracterização histoquímica e ultra-estrutural.

*Tricoma secretor do Tipo IV* - formado por uma célula basal proeminente, pedicelo curto unicelular e cabeça secretora 4-celular em forma de ampola recoberta por cutícula espessa (Figs. **18-20**). As etapas iniciais do desenvolvimento do tricoma secretor do Tipo IV são bastante similares às descritas para o Tipo III, sendo que na fase final do desenvolvimento a célula secretora em forma de ampola passa por duas divisões anticlinais sucessivas originando uma cabeça 4-celular (Fig. **35-39**). Este tricoma, mesmo na fase secretora não mostra espaço subcuticular, contudo se caracteriza pela presença de um amplo espaço periplasmático (Fig. **20**).

Os testes histoquímicos detectaram polissacarídeos neutros no protoplasto, espaço periplasmático e parede das células da cabeça secretora (Fig. **67**), lipídeos no

protoplasto da célula do pedicelo (Fig. 68) e proteínas no protoplasto das células da cabeça secretora e do pedicelo (Fig. 69).

Ultra-estruturalmente, as células da cabeça secretora se caracterizam por apresentar parede pecto-celulósica espessa, espaço periplasmático amplo, núcleo volumoso, citoplasma denso e vacúolos desenvolvidos (Figs. 70, 72). A parede celular possui aspecto laxo onde se vêem acúmulos de material osmiofílico por entre as fibrilas de celulose; o espaço periplasmático, bastante desenvolvido na fase secretora, contém material fibrilar de aparência laxa, podendo conter grumos de material denso (Figs. 71, 72, 77, 78, 79). No citoplasma ocorrem plastídeos, retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos (Figs. 70, 72, 73). Os plastídeos são polimórficos, destituídos de membranas internas, com estroma finamente granular contendo inclusões globulares elétron-densas (Fig. 73). O retículo endoplasmático rugoso e os dictiossomos são as organelas mais abundantes e desenvolvidas (Fig. 74). Os vacúolos são de dois tipos (Figs. 72-76), sendo observados vacúolos amebóides, alongados segundo o eixo maior da célula e preenchidos por material de aspecto fibrilar/filamentoso, provavelmente de natureza protéica (Fig. 75) e vacúolos menores, mais ou menos esféricos contendo fibrilas dispersas e grumos de material elétron-denso (Fig. 76). Vesículas oriundas dos dictiossomos e do retículo endoplasmático são observadas em abundância no citoplasma periférico; imagens sugerem que vesículas contendo material fibrilar se fundem com a membrana plasmática e liberam o conteúdo no espaço periplasmático (Figs. 77, 78). Inicialmente o material depositado no espaço periplasmático é fibrilar e possui uma aparência frouxa (Fig. 78). Na medida em que a secreção progride, o espaço periplasmático fica repleto de um material fibrilar mais denso e compacto, com grumos osmiofílicos (Fig. 79).

As células do pedicelo apresentam núcleo com nucléolo evidente, e quando comparadas às células da cabeça secretora mostram citoplasma menos denso onde são observados dictiossomos, plastídeos e muitos vacúolos pequenos (Figs. **70, 80**). Os plastídeos variam de globóides a amebóides, não possuem membranas internas e podem conter inclusões fibrilares e/ou homogêneas fortemente elétrôn-densas (Figs. **80-82**). Mitocôndrias e dictiossomos são esparsos e pouco desenvolvidos (Figs. **80-82**). Plasmodesmos são observados nas paredes transversais do pedicelo, conectando-o com a célula basal e células da cabeça secretora (Fig. **82**).

*Tricoma secretor do Tipo V* - apresenta uma célula basal, pedicelo longo bicelular, célula colar e cabeça secretora formada por quatro células recobertas por cutícula espessa (Figs. **21, 22**). A célula protodérmica precursora do tricoma secretor do Tipo V é papiliforme e maior que as células adjacentes. Através de sucessivas divisões periclinais assimétricas, é formada uma fileira unisseriada de cinco células que correspondem à célula basal, duas células do pedicelo, célula colar e célula inicial da cabeça secretora. Esta célula, por meio de duas divisões anticlinais sucessivas origina a cabeça secretora 4-celular (Figs. **40-44**).

Os testes histoquímicos revelaram a presença de óleos essenciais, polissacarídeos neutros, proteínas e lipídeos nas células da cabeça secretora e na célula colar (Figs. **83-87**).

Ultra-estruturalmente, as células da cabeça secretoras se caracterizam por apresentar núcleo esférico e central com nucléolo evidente, citoplasma abundante com numerosas gotas lipídicas e vacúolos pequenos e escassos (Figs. **88-90**). Os plastídeos são globóides e apresentam estroma denso e um sistema de túbulos/vesículas osmiofílicas, além de inclusão fortemente elétrôn-densa; é comum a presença de retículo

periplastidial (Fig. 90). Retículo endoplasmático rugoso e liso, poliribossomos, dictiossomos com cisternas longas e mitocôndrias globulares são observados no citoplasma (Fig. 91). Vesículas são observadas na região periférica do citoplasma, nas adjacências da membrana plasmática (Fig. 91).

As paredes laterais do pedicelo, em sua face interna mostram acúmulos de material graxo (Fig. 92). No citoplasma desta célula, notam-se retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, dictiossomos esparsos, gotas lipídicas dispersas e os vacúolos são desenvolvidos (Figs. 93, 94). Os plastídeos, sem membranas internas, contêm estroma homogêneo finamente granular e inclusões elétron-densas de diferentes tamanhos (Figs. 94, 95). Plasmodesmos são observados nas paredes transversais das células do pedicelo (Figs. 93, 95).

As características mais relevantes dos tricomas secretores aqui descritos estão compiladas na tabela 1 e os resultados dos testes histoquímicos são resumidos na tabela 2.

## **Discussão**

As análises realizadas neste trabalho permitiram distinguir em *L. stachyoides* cinco tipos morfológicos de tricomas secretores capitados, sendo a variedade morfológica aqui observada maior que a geralmente reportada para as espécies de Verbenaceae já estudadas (Corrêa, 1992; Bonzani *et al.*, 1997; Bonzani *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Combrinck *et al.*, 2007). Variações no número de células da cabeça dos tricomas capitados em espécies de *Lippia* foram reportadas por Bonzani *et al.* (2003), que descreveram para *L. integrifolia* e *L. turbinata* a presença de tricomas glandulares com

cabeça composta de uma a quatro células e para *L. junelliana*, cabeças pluricelulares. No presente trabalho, com base em análises integradas de anatomia, ontogênese, histoquímica e ultra-estrutura, optou-se por considerar as diferenças no número de células como sendo indicadoras de tipos diferentes de tricomas secretores.

Uma alta diversidade de tricomas capitados, com variações no tamanho do pedicelo e na forma e número de células da cabeça secretora tem sido detectada em táxons relacionados da ordem Lamiales, a qual pertence Verbenaceae (Werker *et al.*, 1985; Werker *et al.*, 1993; Ascensão *et al.*, 1995; Ascensão *et al.*, 1999; Krstic *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2006; Combrinck *et al.*, 2007; Grubestic *et al.*, 2007; Kamatou *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2007). Segundo Ascensão *et al.* (1999) que descreveram diversos tipos de tricomas glandulares em folhas e flores de *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae), a diversidade morfológica dessas estruturas, embora negligenciada na maioria dos trabalhos, associa-se com processos distintos de secreção e composição química distinta do exsudato. No presente trabalho, embora não tenham sido realizadas análises químicas da secreção, os resultados das análises histoquímicas associadas às características ultra-estruturais dos tricomas secretores sugerem que a diversidade morfológica observada em *L. stachyoides* é acompanhada por diferenças na composição química da secreção.

Tricoma secretor com morfologia similar ao Tipo I de *L. stachyoides*, o qual é composto de uma célula basal, pedicelo curto unicelular, célula colar e cabeça esférica formada por quatro células secretoras parece ocorrer em *Lippia scaberrima* estudada por Combrinck *et al.* (2007); no entanto, os autores não mencionam a presença da célula colar. Os autores descreveram também tricomas secretores peltados bulbosos com cabeça composta de uma célula, os quais representam sítios de acúmulo dos óleos essenciais, sendo a presença de terpenóides verificada por meio de microscopia de



fluorescência. Tricomas similares a este quanto a morfologia e composição da secreção foram observados em *L. stachyoides* (Tipo II), contudo diferem dos de *L. scaberrima* pela presença da célula colar.

Tricomas secretores capitados semelhantes ao Tipo I de *L. stachyoides*, com base unicelular, pedicelo curto e cabeça formada por quatro células têm sido descritos para espécies de Lamiaceae por diferentes autores (Antunes *et al.*, 1997, Ascensão e Pais, 1998, Bisio *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 2006). No entanto, em *Ocimum basilicum* L., uma Lamiaceae, tricoma semelhante ao Tipo I de *L. stachyoides* foi considerado como sendo peltado por Werker *et al.* (1993).

Santos *et al.* (2004) relataram três tipos de tricomas secretores para *L. alba*, sendo aqueles com uma célula basal, pedicelo (considerada pelos autores como célula intermediária) e cabeça secretora muito similares ao Tipo I de *L. stachyoides*, contudo em *L. alba* a cabeça secretora é bicelular e 4-celular em *L. stachyoides*. Aqueles formados por uma célula basal estreita e uma porção capitada globosa são semelhantes ao Tipo II, porém os autores não descrevem a presença da célula colar observada em *L. stachyoides*. Já tricomas com uma célula basal, um pedicelo alongado bicelular e uma porção capitada bicelular, descritos por Santos *et al.* (2004), não foram encontrados, porém pode ser uma variação do Tipo V descrito no presente trabalho.

Grubestic *et al.* (2007), descreveram para algumas espécies de *Teucrium*, uma Lamiaceae, tricomas capitados com pedicelo de uni a 4-celular e cabeça secretora com uma a quatro células, chamados por este autor de Tipo B. Já no presente trabalho, tricomas secretores com pedicelo curto e com pedicelo longo são considerados como tipos diferentes (Tipo I e Tipo V, respectivamente).

O processo de ontogênese dos tricomas secretores de *L. stachyoides* é similar ao descrito para diferentes espécies, como *Artemisia campestris* (Ascensão e Pais, 1987) e

*Leonotis leonurus* (Ascensão *et al.*, 1995) pertencentes a táxons distintos, sendo a célula precursora dos diferentes tipos de tricomas sempre maior que as protodérmicas adjacentes. Em *L. stachyoides*, é possível diferenciar os tipos de tricomas secretores já na etapa inicial da sua ontogênese pelo formato da célula precursora, que se apresenta protuberante no Tipo I, arredondada nos Tipos II, III e IV e papiliforme no Tipo V.

A análise histoquímica indicou em todos os tipos de tricomas secretores a presença de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, característica comum a tricomas de diferentes espécies (Serrato-Valenti *et al.*, 1997; Ascensão e Pais, 1998; Marin *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006). Contudo, nos tricomas Tipo I e IV há predomínio de substâncias hidrofílicas e nos Tipos II e V predominam substâncias lipofílicas.

A presença de óleos essenciais nos tricomas dos Tipos II e V de *L. stachyoides* indica que os sítios de produção dessas substâncias nesta espécie são os tricomas secretores, conforme já relatado para outras espécies de *Lippia* (Santos *et al.*, 2004; Aguiar e Costa, 2005; Combrinck *et al.*, 2007; Mevy *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

De um modo geral, as características ultra-estruturais dos diferentes tipos de tricomas secretores de *L. stachyoides* corroboram os resultados dos testes histoquímicos realizados, sendo que a maquinaria celular dos tricomas condiz com os tipos de substâncias detectadas. Algumas características gerais dos tricomas secretores de *L. stachyoides* como citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo evidente e mitocôndrias com cristas desenvolvidas são típicas de tecidos secretores com alta atividade metabólica (Sachetti *et al.*, 1999).

O tricoma secretor Tipo I de *L. stachyoides* apresenta retículo endoplasmático rugoso e dictiossomas como as organelas mais abundantes no citoplasma das células da cabeça secretora. Além disso, foram observados grânulos densos de proteínas livres no citoplasma, no espaço periplasmático e na parede. Estas características têm sido

associadas com secreção hidrofílica (Fahn, 1979, 1988; Bourett *et al.*, 1994; Ascensão e Pais, 1998; Machado *et al.*, 2006). Embora no Tipo I de *L. stachyoides* haja a formação de um espaço subcuticular onde a secreção se acumula, não foi observado rompimento da cutícula, nem a ocorrência de poros cuticulares.

A célula da cabeça secretora do tricoma secretor do Tipo II de *L. stachyoides* possui um único, central e volumoso vacúolo no interior do qual foram detectados óleos essenciais, proteínas, lipídeos e alcalóides. Segundo alguns autores (Campbell e Thomson, 1976; Figueiredo e Pais, 1994) tal característica sugere a estocagem da secreção dentro desses vacúolos antes de sua eliminação. A presença de retículo endoplasmático liso e plastídeos com estroma fortemente elétron-denso na célula da cabeça secretora sugere que a mesma esteja envolvida na secreção lipídica. Já a produção de proteínas e alcalóides provavelmente ocorra na célula colar, onde predomina retículo endoplasmático rugoso (Fahn, 1979, 1988).

No tricoma do Tipo IV de *L. stachyoides*, a abundância de retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos desenvolvidos são evidências de secreção hidrofílica composta principalmente de polissacarídeos, produzidos pelos dictiossomos, e proteínas, produzidas no retículo endoplasmático rugoso (Fahn, 1979, 1988). Aspecto fibrilar da secreção no interior de vacúolos e no espaço periplasmático foi observado por Ascensão e Pais (1998) em *Leonotis leonurus* (Lamiaceae) que detectaram, com o método de Thiéry, a natureza mucilagínosa da secreção.

No tricoma secretor do Tipo V de *L. stachyoides* a presença de plastídeos destituídos de membranas internas e com inclusões elétron-densas, dictiossomos pouco desenvolvidos e abundância de gotas lipídicas dispersas no citoplasma são indícios de secreção predominantemente lipídica (Fahn, 1979, 1988; Sachetti *et al.*, 1999; Machado

*et al.*, 2006), corroborando os resultados histoquímicos positivos para os testes com Sudan IV e Reagente de Nadi.

O espessamento das paredes laterais do pedicelo dos tricomas secretores capitados de *L. stachyoides* proporciona uma barreira ao transporte apoplástico; já, a presença de plasmodesmas nas paredes periclinais indica a via simplástica de transporte de precursores do mesofilo para o tricoma secretor e entre as células do próprio tricoma, característica observada em diferentes tipos de tricomas secretores (Fahn, 1988; Bourett *et al.*, 1994; Ascensão e Pais, 1998; Gravano *et al.*, 1998; Sacchetti *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2006). A ausência de cloroplasto nas células secretoras e a presença de plasmodesmas abundantes nas paredes periclinais do pedicelo podem representar a necessidade de transporte intercelular (Ascensão e Pais, 1998).

A presença de numerosas vesículas no citoplasma dos tricomas secretores dos Tipos I e IV, que provavelmente se fundem à membrana plasmática e liberam a secreção contida nelas para fora do protoplasto, sugere um mecanismo granulócrico de secreção (Fahn, 1979). Já nos tricomas secretores dos Tipos II e V, vesículas não são observadas, podendo sugerir um mecanismo écrino de secreção, no qual as moléculas atravessam a membrana plasmática da célula secretora como resultado de um gradiente de concentração ou por processo ativo (Fahn, 1979).

De um modo geral, tem sido reportado que o exudato dos tricomas secretores é eliminado para o meio externo pela ruptura da cutícula causada pelo contato de predadores (Werker, 1993) ou em condições naturais, através de poros cuticulares (Ascensão *et al.*, 1995), ou por exudação através da cutícula (Werker e Fahn, 1981; Werker *et al.*, 1985; Serrato-Valenti *et al.*, 1997). Rompimento da cutícula e/ou poros cuticulares não foram observados nos tricomas secretores de *L. stachyoides*, sugerindo que ocorra exudação da secreção através da cutícula para o meio externo,

principalmente dos óleos essenciais produzidos pelos tricomas dos tipos II e V, que são altamente voláteis.

A ocorrência de tricomas secretores tanto em órgãos vegetativos como em reprodutivos de *L. stachyoides* sugere que as substâncias por eles produzidas estejam envolvidas na defesa química da planta e na interação com animais, especialmente polinizadores, como já observado por Ascensão *et al.* (1999) em *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae). A presença de substâncias fenólicas no tricoma secretor do Tipo I de *L. stachyoides*, pode indicar o envolvimento deste na proteção dos órgãos contra a radiação solar (Liakoura *et al.*, 1997). Óleos essenciais nos tricomas Tipo II e Tipo V de *L. stachyoides*, além de alcalóides no tricoma Tipo II podem estar envolvidos na defesa química da planta. Terpenóides possuem atividade antibiótica, fungicida, inseticida e deterrente (Wagner, 1991; Bisio *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Combrinck *et al.*, 2007) e alcalóides são extremamente tóxicos para muitos herbívoros (Levin, 1973; Wagner, 1991; Wagner *et al.*, 2004). Nos tricomas do Tipo IV de *L. stachyoides*, a presença de polissacarídeos, devido suas propriedades hidrofílicas, podem atuar como lubrificante, facilitador na expansão foliar e na manutenção do potencial hídrico (Ascensão *et al.*, 1995; Ascensão *et al.*, 1999).

O presente estudo mostrou uma importante diversidade morfológica, histoquímica e ultra-estrutural dos tricomas secretores em *L. stachyoides*. Provavelmente, esta diversidade está associada com a composição química da secreção. As informações obtidas poderão subsidiar a elaboração de novas propostas de estudos visando a compreensão e exploração da habilidade dos diferentes tipos de tricomas secretores de *L. stachyoides* na produção de substâncias biologicamente ativas.

## **Agradecimentos**

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Proc. MS 06/58170-5) pela bolsa de mestrado e à equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP, Botucatu, pelo auxílio no preparo das amostras.

## **Referências Bibliográficas**

- Aguiar, J.S. e Costa, M.C.C.D. (2005) *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **8**, 79-84.
- Andrighetti-Fröhner, C.R.; Sincero, T.C.M.; Silva, A.C.; Savi, L.A.; Gaido, C.M.; Bettega, J.M.R.; Mancini, M.; Almeida, M.T.R.; Barbosa, R.A.; Farias, M.R.; Barardi, C.R.M. e Simões, C.M.O. (2005) Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*. **76**, 374-8.
- Angermüller, S. e Fahimi, D.H. (1982) Imidazole-buffered osmium tetroxide: na excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochemistry Journal*. **14**, 823-825
- Antunes T.; Sevinate – Pinto, I.; Barroso, J.G.; Figueiredo, A.C.; Pedro, L.G.; Fontinha, S.S. e Scheffer, J.J.C. (1997) Morphology and distribution of trichomes in two endemic *Teucrium* species of Macaronesia. *Acta Botanica Gallica*. **144**, 363-369.
- Ascensão, L. e Pais, S.S. (1987) Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. maritima): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette*. **148**, 221-227.
- Ascensão, L. e Pais, M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany*. **81**, 263-271.

- Ascensão, L.; Marques, N. e Pais, M.S. (1995) Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **75**, 619-626.
- Ascensão, L.; Mota, L. e Castro, M.M. (1999) Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*. **84**, 437-447.
- Bisio, A.; Corillo, A.; Gastaldo, P.; Romussi, G.; Ciarallo, G.; Fontana, N.; Tommasi, N. e Profumo, P. (1999) Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegee ex epling grown in Italy. *Annals of Botany*. **83**, 441-452.
- Bonzani, N.E.; Filippa, E.M. e Barboza, G.E. (1997) Particularidades epidérmicas en algunas especies de Verbenaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. **68**, 47-56.
- Bonzani, N.E.; Filippa, E.M. e Barboza, G.E. (2003) Estudio anatomico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. **74**, 31-45.
- Bourett, T.M.; Howard, R.J.; O'Keefe, D.P. e Hallahan, D.L. (1994) Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *International Journal of the plant science*. **155**, 623-632.
- Campbell, N. e Thomson, W.W. (1976) The ultrastructure of *Frankenia* salt glands. *Annals of Botany*. **40**, 681-686.
- Cheng, A.; Lou, Y.; Mao, Y.; Lu, S.; Wang, L. e Chen, X. (2007) Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. **49**, 179-786.

- Combrinck, S.; Du Plooy, G.W.; Mc Crindle, R.I. e Botha, B.M. (2007) Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany*. **99**, 1111-1119.
- Corrêa, C.B.V. (1992) Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N. E. BR. ex Britt & Wilson – erva cidreira. *Revista Brasileira de Farmácia*. **3**, 57-64.
- David, R. e Carde, J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*. **258**, 1338-1340.
- Duarte, M.C.T.; Figueira G.M.; Sartoratto A.; Rehder V.L.G. e Delarmelina C. (2005) Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**, 305-311.
- Dwivedi, S.K. e Kishore, N. (1990) Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. *Indian Perfumer*. **34**, 20-1.
- Fahn, A. (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press. 301p.
- Fahn, A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New phytologist*. **108**, 229-257.
- Figueiredo, A.C. e Pais, M.S.S. (1994) Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Annals of Botany*. **74**, 179-790.
- Furr, M. e Mahlberg, P.G. (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*. **44**, 153-159.
- Gravano, E.; Tani, C.; Bennicci, A. e Gucci, R. (1998) The ultrastructure of glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) leaves. *Annals of Botany*. **81**, 327-335.
- Grubestic, R.J.; Vladimir-Knezevic, S.; Kremer, D.; Kalodera, Z. e Vukovic, J. (2007) Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing Croatia. *Biologia, Bratislava*. **62**, 148-156.



Guignard, J.L. e Dupont, F. (2004) *Botanique systématique moléculaire*. Masson, Paris.

13° ed.

Hassan, M.A. e Begum S. (2001) Taxonomic significance of foliar trichomes of some species of Verbenaceae from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, Dhaka.

**30**, 75-78.

Jensen, W.A. (1962) *Botanical histochemistry: principle and practice*. San Francisco:

W.H Freeman. 408p.

Johansen, D.A. 1940. *Plant micro technique*. New York: McGraw-Hill, 523p.

Kamatou, G.P.P.; Viljoen, A.M.; Figueiredo, A.C.; Tilney, P.M.; Van Zyu, R.L.;

Barroso, J.G.; Pedro, L.G. e Van Vuuren, S.F. (2007) Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica*

Codd, two species from the cape region of South African. *South African Journal of Botany*. **73**, 102-108.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. **27**, 137 - 138.

Kaya, A.; Demirci, B. e Baser, K.H.C. (2007) Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. e Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis

of the essential oils. *South African Journal of Botany*. **73**, 29-34.

Kishore, N. e Mishra, A. K. (1991) Effect of essential oils on sclerotial germination of *Rhizoctonia solani*. *National Academy Science Letters*. **14**, 239-40.

Kishore, N; Dubey, N. K. e Mishra, A. K. (1993) Efficacy of essential oils against fungi causing deterioration of *Triticum aestivum* during storage. *Indian Journal of*

*Microbiology*. **33**, 277-80.

- Krstic, L.; Malencic, D. e Anackov, G. (2006) Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Botanica Helvetica*. **116**, 159-168.
- Leal, L.K.A.M.; Oliveira, V.M.; Araruna, S.M.; Miranda, M.C.C. e Oliveira, F.M.A. (2003) Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **13**, 09-11.
- Levin, D.A. (1973) The role of trichomes in plant defense. *The quarterly review of biology*. **48**, 3-15.
- Liakoura, V.; Stefanou, M.; Manetas, Y.; Cholevas, C. e Karabourniotis, G. (1997) Trichome density and its UB-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and Experimental Botany*. **38**, 223-229.
- Machado, S.R.; Gregório, E. A. e Guimarães, E. (2006) Ovary peltate trichomes of *Zeyheria Montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany*. **97**, 357-369.
- MacRae, E.K. e Meetz, G.D. (1970) Electron microscopy of the amonniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. *Journal Cell. Biology*. **45**, 235-245.
- Marin, M.; Koko, V.; Duletic-Lausevic, S.; Marin, P.D.; Ranile, D. e Dajic-Stevanovic, Z. (2006) Glandular trichomes on leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*. **72**: 378-382.
- McIlvaine, T.C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal Biology and Chemistry*. **49**, 183-186.
- McManus, J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. **23**: 99-108.

- Mevy, J.P.; Bessiere, J.M.; Dherbomez, M.; Millogo, J. e Viano, J. (2007) Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of chemotipy of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chemistry*. **101**, 682-685.
- Moldenke, H.N. (1965) Materials toward a monograph of the genus *Lippia*. I. *Phitologia*. Plainfield. **12**, 6 – 71.
- Nunes, R.S.; Xavier, H.S.; Rolim Neto, P.J.; Santana, D.P. e Albuquerque, U.P. (2000) Botanical standardization of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, La Plata. **19**, 115-118.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. e Cully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walla by toluidine blue. *O protoplasma*. **59**, 369-376.
- Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S. e Leitão, G.S. (2007) Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*. **101**, 236-240.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D. e Villar, A. (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**, 201-214.
- Pérez, S.; Meckes, M.; Pérez, C.; Susunaga, A. e Zavala M.A. (2005) Anti-inflammatory activity of *Lippi dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **102**, 1-4.
- Pimenta, M.R.; Fernandes, L.S.; Pereira, U.J.; Garcia, L.S.; Leal, S.R.; Leitão, S.G.; Salimena, F.R.; Viccini, L.F. e Peixoto, P.H.P. (2007) Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. **30**, 211-220.
- Reinecke, M. e Walther, C. (1978) Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. *Journal of Cell Biology*. **21**, 839-855.

- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. **17**, 208.
- Robards, A.W. (1978) An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J.L. Hall (eds.). New York, Elsevier.
- Sachetti, G.; Romagnoli, C.; Nicoletti, M.; Di Fabio, A.; Bruni, A. e Poli, F. (1999) Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. *Annals of Botany*. **83**, 87-92.
- Salimena, F.R.G. (2002) Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* SCT. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*. **40**, 121-125.
- Santos, M.R.A.; Innecco, R. e Soares, M.A. (2004) Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. *Revista Ciência Agronômica*. **35**, 377-383.
- Serrato-Valenti, G.; Bisio, A.; Cornara, L. e Ciarallo, G. (1997) Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*. **79**, 329-336.
- Souza, V.C. e Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática: um guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Viljoen, A. M.; Subramoney, S.; Van Vuuren, S.F.; Baser, K.H.C. e Demirci, B. (2004) The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**, 271-277.

- Wagner, G.I.; Wang, E. e Shepherd, W. (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*. **93**, 3-11.
- Wagner, G.J. (1991) Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiologist*. **96**, 675-679.
- Werker, E. e Fahn, A. (1981) Secretary hairs os *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure, and secretion. *Botanical Gazette*. **142**, 461-476.
- Werker, E.; Putievsky, E. e Ravid, U. (1985) The essential oils and glandular hairs and in different chemotypes of *Origanum vulgare* L.. *Annals of Botany*. **55**, 793-801.
- Werker, E (1993) Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – a review. *Flavour and Fragrance Journal*. **8**, 249-255.
- Werker, E.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N. e Katzir, I. (1993) Glandular hair and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **71**, 43-50.
- Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L D. e Maia, J.G.S. (2002) Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**, 29-31.

**Tabela 1.** Principais características morfológicas, ultra-estruturais e histoquímicas dos tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae)

Tricoma secretor	Morfologia	Ultra-estrutura	Histoquímica
<b>Tipo I</b>	Célula epidérmica basal, pedicelo curto bicelular, célula colar e cabeça multicelular esférica formada por quatro células secretoras.	<i>Cabeça secretora:</i> Citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo evidente, vacúolos pequenos e numerosos; plastídeos polimórficos, sem membranas internas e contendo matriz homogênea com inclusões fortemente elétron-densas; mitocôndrias com cristas desenvolvidas, retículo endoplasmático rugoso; dictiossomos; grânulos densos de proteínas livres no citoplasma, no espaço periplasmático e impregnadas na parede; secreção acumulada no espaço periplasmático; formação de espaço subcuticular.	Polissacarídeos neutros, proteínas, lipídeos totais e compostos fenólicos.
<b>Tipo II</b>	Célula epidérmica basal, célula colar e cabeça secretora unicelular globóide. Esse tipo não apresenta pedicelo	<i>Cabeça secretora:</i> único, central e volumoso vacúolo; citoplasma denso e periférico; numerosas mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático liso e plastídeos com estroma fortemente elétron-denso. <i>Célula colar:</i> mitocôndrias volumosas com cristas desenvolvidas, retículo endoplasmático rugoso.	Óleos essenciais, proteínas, lipídeos totais e alcalóides.
<b>Tipo IV</b>	Célula epidérmica basal proeminente, um pedicelo curto unicelular e cabeça secretora 4-celular em forma de ampola.	<i>Cabeça secretora:</i> amplo espaço periplasmático; parede celular de aspecto laxo e com acúmulos de material osmiofílico; numerosos plastídeos polimórficos sem membranas internas e com inclusões elétron-densas; retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos abundantes; vacúolos de dois tipos: amebóides alongados segundo o eixo maior da célula e preenchidos por material de aspecto cristalino provavelmente de natureza protéica e vacúolos menores, mais ou menos esféricos contendo fibrilas dispersas e grumos de material elétron-denso; vesículas provenientes dos dictiossomos e retículo endoplasmático em abundância no citoplasma periférico. <i>Pedicelo:</i> dictiossomos, plastídeos polimórficos, sem membranas internas contendo inclusões fibrilares e/ou homogêneas elétron-densas; muitos vacúolos pequenos; plasmodesmos nas paredes transversais.	Polissacarídeos neutros, proteínas e lipídeos totais.
<b>Tipo V</b>	Célula epidérmica basal, pedicelo longo bicelular, célula colar e cabeça secretora em forma de bulbo 4-celular.	<i>Cabeça secretora:</i> citoplasma denso; numerosas gotas lipídicas, vacúolos pequenos e escassos, plastídeos globóides com estroma denso e um sistema de túbulos/vesículas osmiofílicas e inclusão homogênea fortemente elétron-densa com retículo periplastidial; retículo endoplasmático rugoso e liso, poliribossomos, dictiossomos com cisternas longas. <i>Pedicelo:</i> paredes laterais com acúmulos de material graxo em sua face interna; abundantes vacúolos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, dictiossomos escassos e gotas de material lipofílico; plastídeos, sem membranas internas, com estroma homogêneo finamente granular e inclusões elétron-densas de diferentes tamanhos; plasmodesmos nas paredes transversais do pedicelo.	Óleos essenciais, polissacarídeos neutros, proteínas e lipídeos totais.

**Tabela 2.** Resultados dos testes histoquímicos dos tricomas secretores em *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae)

Reagente	Substância	Tipo de Tricoma Secretor			
		Tipo I	Tipo II	Tipo IV	Tipo V
Reagente de Nadi	Óleos essenciais	-	+	-	+
PAS	Polissacarídeos Neutros	+	-	+	+
Vermelho de Rutênio	Polissacarídeos Ácidos	-	-	-	-
Azul Mercúrio de Bromofenol	Proteínas	+	+	+	+
Sudan IV	Lipídeos Totais	+	+	+	+
Cloreto Férrico	Compostos Fenólicos	+	-	-	-
Lugol	Amido	-	-	-	-
Reagente de Wagner & Dittmar	Alcalóides	-	+	-	-

+: reação positiva; -: reação negativa

## Legenda das Figuras

**Figs. 1-5.** Aspecto geral da morfologia de *Lippia stachyoides*. **(1)** Subarbusto com ramos formando uma touceira. **(2)** Detalhe de ramo pubescente mostrando filotaxia oposta nos nós basais e verticilada nos nós apicais. **(3)** Folhas mostrando formato elíptico a ovado, bordo serrado e ápice agudo. **(4)** Inflorescências axilares reunidas em cachos. **(5)** Detalhe da inflorescência mostrando bractéolas (setas) que sustentam pequenas flores roxas. Barras: **1-2** = 6cm; **3** = 3cm; **4** = 2cm; **5** = 1 cm.

**Figs. 6-12.** Distribuição dos tricomas secretores em *Lippia stachyoides*. **(6)** Superfície adaxial do limbo foliar vista ao MEV. Notar concentração de tricomas secretores (setas) nas impressões das nervuras. **(7)** Superfície abaxial do limbo foliar vista ao MEV mostrando distribuição aleatória de tricomas secretores. **(8)** Aspecto geral das bractéolas presentes nas inflorescências, mostrando abundância de tricomas não secretores na superfície abaxial. **(9)** Superfície adaxial das bractéolas com tricomas secretores (setas) distribuídos por toda extensão. **(10)** Corte transversal de flor mostrando tricomas secretores na superfície abaxial de sépala. **(11)** Aspecto geral da corola vista ao MEV. Nota-se que a concentração de tricomas aumenta em direção ao ápice da corola tubular. **(12)** Corte transversal do filete mostrando concentração de tricomas secretores. Barras: **6** = 450µm; **7** = 300µm; **8** = 100µm; **9** = 100µm; **10** = 120µm; **11** = 120µm; **12** = 100µm.

**Figs. 13-22.** Tricomas secretores de *Lippia stachyoides*. **(13)** Tricoma secretor do tipo I visto ao MEV mostrando pedicelo curto unicelular, célula colar e cabeça secretora formada por quatro células. **(14)** Tricoma secretor do tipo I em corte transversal, mostrando célula



basal, célula colar e cabeça secretora. **(15)** Tricoma secretor do tipo II visto ao MEV. **(16)** Tricoma secretor do tipo II visto em corte transversal. Notar célula basal, célula colar e cabeça secretora unicelular. **(17)** Tricoma secretor do tipo III visto em corte transversal, mostrando célula basal proeminente, pedicelo curto unicelular e cabeça secretora unicelular em forma de ampola com amplo espaço subcuticular (asterisco). **(18)** Tricoma secretor do tipo IV visto ao MEV, revestido por cutícula irregular. **(19)** Tricoma secretor do tipo IV visto em corte transversal. Notar célula basal, pedicelo unicelular e cabeça secretora 4-celular em forma de ampola. **(20)** Tricoma secretor do tipo IV visto em corte transversal mostrando amplo espaço periplasmático (asterisco). **(21)** Tricoma secretor do tipo V visto ao MEV. **(22)** Tricoma secretor do tipo V visto em corte transversal, mostrando célula basal, pedicelo longo bicelular, célula colar e cabeça secretora formada por quatro células. Barras: **13** = 10 $\mu$ m; **14** = 80 $\mu$ m; **15** = 20 $\mu$ m; **16** = 30 $\mu$ m; **17** = 70 $\mu$ m; **18** = 8 $\mu$ m; **19** = 70 $\mu$ m; **20** = 70 $\mu$ m; **21** = 20 $\mu$ m; **22** = 30 $\mu$ m.

**Figs. 23-41.** Ontogênese dos tricomas secretores de *Lippia stachyoides*. **(23-26)** Etapas sucessivas do desenvolvimento do tricoma secretor do tipo I. **(27-30)** Etapas sucessivas do desenvolvimento do tricoma secretor do tipo II. **(31-34)** Etapas sucessivas do desenvolvimento do tricoma secretor do tipo III. **(35-39)** Etapas sucessivas do desenvolvimento do tricoma secretor do tipo IV. **(40-44)** Etapas sucessivas do desenvolvimento do tricoma secretor do tipo V. Barras: **23-44**= 30 $\mu$ m.

**Figs. 45-49.** Testes histoquímicos mostrando reações positivas para diferentes grupos de substâncias presentes no tricoma secretor do tipo I. **(45)** Branco. **(46)** PAS. **(47)** Azul

Mercúrio de Bromofenol. (48) Sudan IV. (49) Cloreto Férrico. Barras: 45 = 70µm; 46-47 = 60µm; 48-49 = 50µm.

**Figs. 50-55.** Ultra-estrutura (MET) do tricoma secretor do tipo I. (50) Aspecto geral das células da cabeça secretora mostrando citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo evidente e pequenos e abundantes vacúolos (asteriscos). Notar espaço periplasmático e espaço subcuticular. (51) Detalhe da célula secretora mostrando plastídeos polimórficos, sem membranas internas, contendo estroma homogêneo com inclusões elétron-densas, mitocôndrias com cristas desenvolvidas e pequenos vacúolos (asteriscos). (52) Detalhe de célula secretora mostrando retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos desenvolvidos, vacúolos elétron-lucentes contendo material membranoso ou floculado (asteriscos). Notar fusão de vesículas com a membrana plasmática (círculo). (53) Detalhe da célula secretora mostrando espaço subcuticular e espaço periplasmático. Notar o aspecto floculado da secreção. (54) Teste do ZIO mostrando cisternas dos dictiossomos com vesículas associadas preenchidas com conteúdo fortemente elétron-denso. Nota-se a presença de inclusões densas no interior das extremidades dilatadas do retículo endoplasmático (setas). (55) Teste da Prata Amoniacal mostrando grânulos de proteína no citoplasma, no interior do espaço periplasmático e associados à parede das células secretoras (setas). Barras: 50 = 15µm; 51 = 40µm; 52 = 3µm; 53 = 4,5µm; 54-55 = 2,5µm.

**Figs. 56-60.** Testes histoquímicos mostrando reações positivas para diferentes grupos de substâncias presentes no tricoma secretor do tipo II. (56) Branco. (57) Reagente de Nadi. (58) Azul Mercúrio de Bromofenol. (59) Sudan IV. (60) Reagente de Wagner & Dittmar. Barras: 56-57 = 90µm; 58 = 80µm; 59 = 50µm; 60 = 60µm.

**Figs. 61-65.** Ultra-estrutura (MET) do tricoma secretor do tipo II. **(61)** Aspecto geral do tricoma mostrando célula da cabeça secretora com único vacúolo central e volumoso e citoplasma denso e periférico e célula colar. **(62)** Conexão entre as células basal, colar e da cabeça secretora por meio de plasmodesmos (setas). Observam-se, ainda, dictiossomas na célula basal, mitocôndrias volumosas e com cristas desenvolvidas na célula colar e na cabeça secretora, e plastídeos com inclusões elétron-densas na célula da cabeça secretora. **(63)** Parte da célula colar e célula da cabeça secretora mostrando espaço periplasmático no pólo distal da célula colar e no pólo basal da célula da cabeça secretora. Notar que na célula da cabeça predominam cisternas de retículo endoplasmático liso, enquanto que na célula colar o retículo endoplasmático é rugoso. **(64)** Detalhe da célula da cabeça secretora mostrando plastídeos com estroma fortemente elétron-denso e dictiossomas. **(65)** Teste do ZIO mostrando marcação das membranas e do conteúdo das cisternas dos dictiossomas e suas vesículas adjacentes das células colar e da cabeça secretora. Notar a ocorrência de espaço periplasmático no pólo distal da célula colar e no pólo basal da célula da cabeça secretora. Barras: **61** = 20 $\mu$ m; **62** = 5 $\mu$ m; **63** = 3 $\mu$ m; **64** = 3 $\mu$ m; **65** = 2 $\mu$ m.

**Figs. 66-69.** Testes histoquímicos mostrando reações positivas para diferentes grupos de substâncias presentes no tricoma secretor do tipo IV. **(66)** Branco. **(67)** PAS. **(68)** Azul Mercúrio de Bromofenol. **(69)** Sudan IV. Barras: **66** = 60 $\mu$ m; **67** = 50 $\mu$ m; **68** = 60 $\mu$ m; **69** = 50 $\mu$ m.

**Figs. 70-76.** Ultra-estrutura (MET) do tricoma secretor do tipo IV. **(70)** Aspecto geral mostrando parede espessa, espaço periplasmático amplo, núcleo volumoso, citoplasma

denso e vacúolos desenvolvidos. **(71)** Detalhe de célula da cabeça secretora mostrando cutícula espessa, parede celular de aspecto laxo com acúmulos de material osmiofílico (seta) e amplo espaço periplasmático contendo material fibrilar de aparência laxa. **(72)** Detalhe de célula da cabeça secretora no qual se observa amplo espaço periplasmático, vacúolos amebóides, alongados segundo o eixo maior da célula e preenchidos por material de aspecto cristalino, e vacúolos menores, mais ou menos esféricos contendo fibrilas dispersas e grumos de material elétron-denso. **(73)** Detalhe de célula da cabeça secretora mostrando vacúolos de diferentes tamanhos e conteúdos e plastídeos polimórficos, sem membranas internas, com estroma finamente granular contendo inclusões globulares elétron-densas. **(74)** Detalhe de célula da cabeça secretora mostrando abundância de retículo endoplasmático rugoso e de dictiossomos desenvolvidos. **(75)** Detalhe de vacúolo amebóide preenchido por material de aspecto fibrilar provavelmente de natureza protéica. **(76)** Detalhe mostrando vacúolos mais ou menos esféricos e contendo fibrilas dispersas e grumos de material elétron-denso. Barras: **70** = 30 $\mu\text{m}$ ; **71** = 3,5 $\mu\text{m}$ ; **72** = 10 $\mu\text{m}$ ; **73** = 5 $\mu\text{m}$ ; **74** = 4 $\mu\text{m}$ ; **75** = 5 $\mu\text{m}$ ; **76** = 4 $\mu\text{m}$ .

**Figs. 77-82.** Ultra-estrutura (MET) do tricoma secretor do tipo IV. **(77)** Detalhe da cabeça secretora no qual se observam vesículas provenientes dos dictiossomos e do retículo endoplasmático em abundância no citoplasma periférico e espaço periplasmático. **(78)** Vesículas (seta) contendo material fibrilar se fundindo com a membrana plasmática. Notar espaço periplasmático contendo material fibrilar de aparência frouxa. **(79)** Detalhe do espaço periplasmático desenvolvido repleto de material fibrilar denso e compacto, com grumos osmiofílicos (setas). **(80)** Célula do pedicelo mostrando pequenos vacúolos, plastídeos polimórficos e mitocôndrias. Notar plasmodesmos (setas) na parede transversal

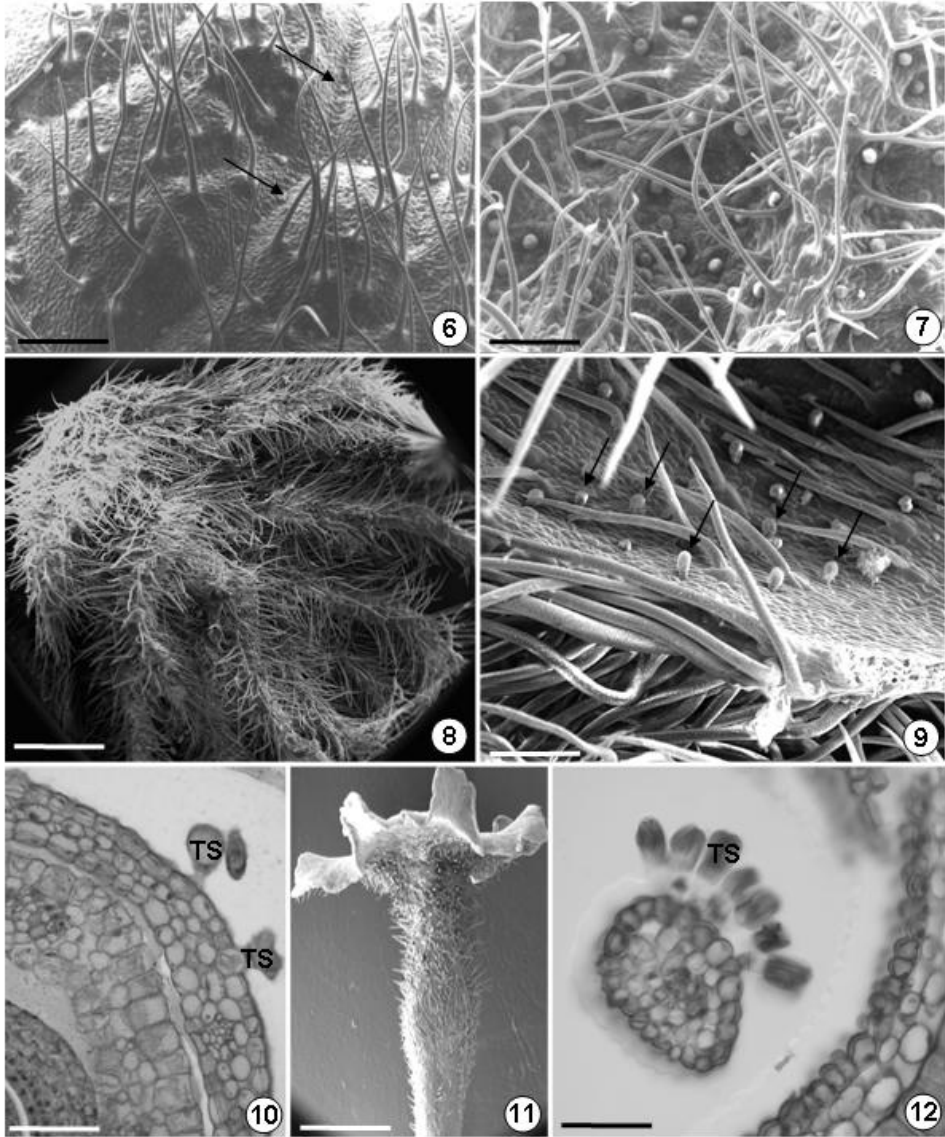
do pedicelo conectando esta célula com a célula basal. **(81)** Detalhe da célula do pedicelo mostrando plastídeo com estroma homogêneo e inclusões elétron-densas e dictiossomo esparso. **(82)** Célula do pedicelo mostrando plastídeos globóides a amebóides, sem membranas internas contendo inclusões fibrilares e glóbulos elétron-densos. Notar plasmodesmos (setas) nas paredes transversais do pedicelo conectando esta célula com a célula da cabeça secretora. Barras: **77** = 3 $\mu$ m; **78** = 1,5 $\mu$ m; **79** = 8 $\mu$ m; **80** = 7 $\mu$ m; **81** = 3 $\mu$ m; **82** = 2 $\mu$ m.

**Figs. 83-87.** Testes histoquímicos mostrando reações positivas para diferentes grupos de substâncias presentes no tricoma secretor do tipo V. **(83)** Branco. **(84)** Reagente de Nadi. **(85)** PAS. **(86)** Azul Mercúrio de Bromofenol. **(87)** Sudan IV. Barras: **83** = 100 $\mu$ m; **84** = 70 $\mu$ m; **85** = 90 $\mu$ m; **86** = 70 $\mu$ m; **87** = 90 $\mu$ m.

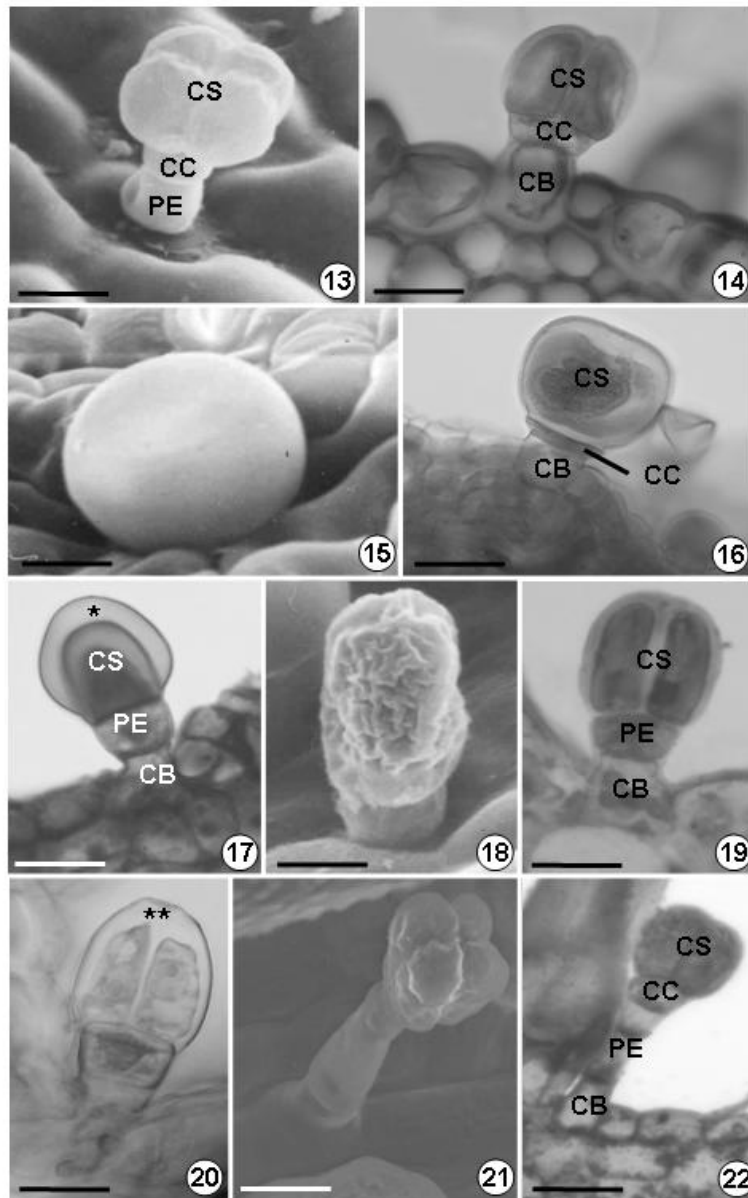
**Figs. 88-95.** Ultra-estrutura (MET) do tricoma secretor do tipo V. **(88)** Aspecto geral do tricoma do tipo V, no qual se observa células da cabeça secretora com citoplasma denso e gotas lipídicas em abundância e células do pedicelo com vacúolos desenvolvidos e plastídeos. **(89)** Detalhe da cabeça secretora mostrando mitocôndrias globulares e gotas lipídicas em abundância. **(90)** Detalhe de célula da cabeça secretora mostrando gotas lipídicas, plastídeos globóides com estroma granular e um sistema de túbulos/vesículas osmioflicas e inclusão homogênea fortemente elétron-densa, retículo endoplasmático liso e retículo periplastidial (seta). **(91)** Detalhe de célula da cabeça secretora mostrando retículo endoplasmático rugoso e liso, poliribossomos, dictiossomos com cisternas longas. Notar vesículas (setas) no citoplasma periférico, nas adjacências da membrana plasmática. **(92)** Detalhe da parede lateral do pedicelo, mostrando, em sua face interna, acúmulos de

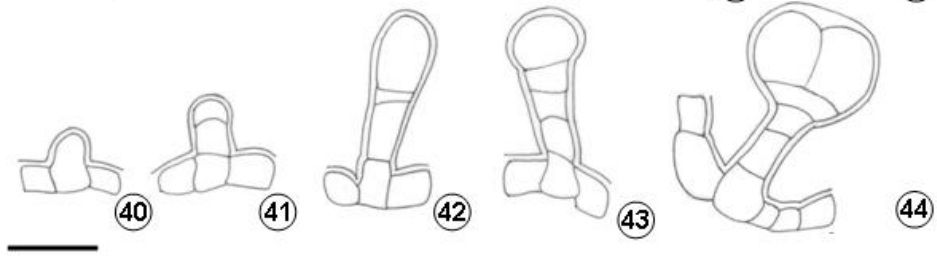
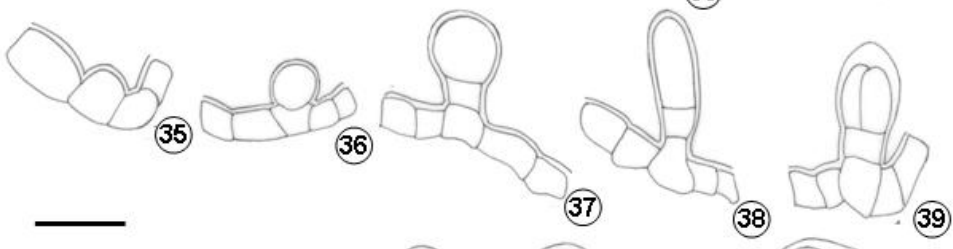
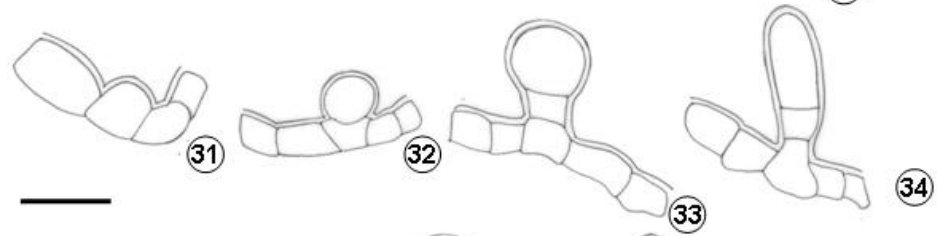
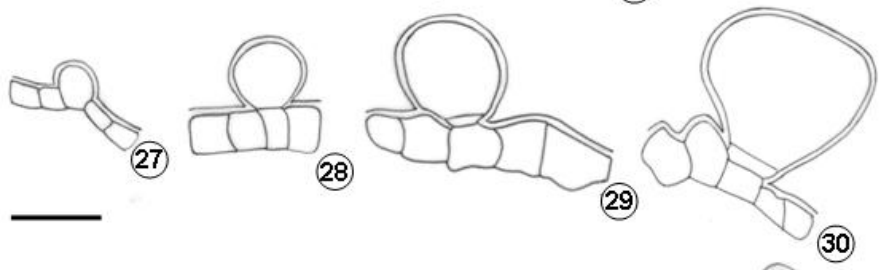
material graxo (setas). **(93)** Detalhe das células do pedicelo mostrando vacúolos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, dictiossomos e gotas lipídicas. Notar plasmodesmos (setas) nas paredes transversais do pedicelo. **(94)** Detalhe de célula do pedicelo mostrando mitocôndrias globulares com cristas desenvolvidas e plastídeos, sem membranas internas, com inclusões elétron-densas de diferentes tamanhos. **(95)** Detalhe de célula do pedicelo mostrando plastídeos e gotas lipídicas dispersas no citoplasma. As setas indicam plasmodesmos. Barras: **88** = 30 $\mu$ m; **89** = 5 $\mu$ m; **90** = 3 $\mu$ m; **91** = 1 $\mu$ m; **92** = 2 $\mu$ m; **93** = 3 $\mu$ m; **94** = 3 $\mu$ m; **95** = 2,5 $\mu$ m.

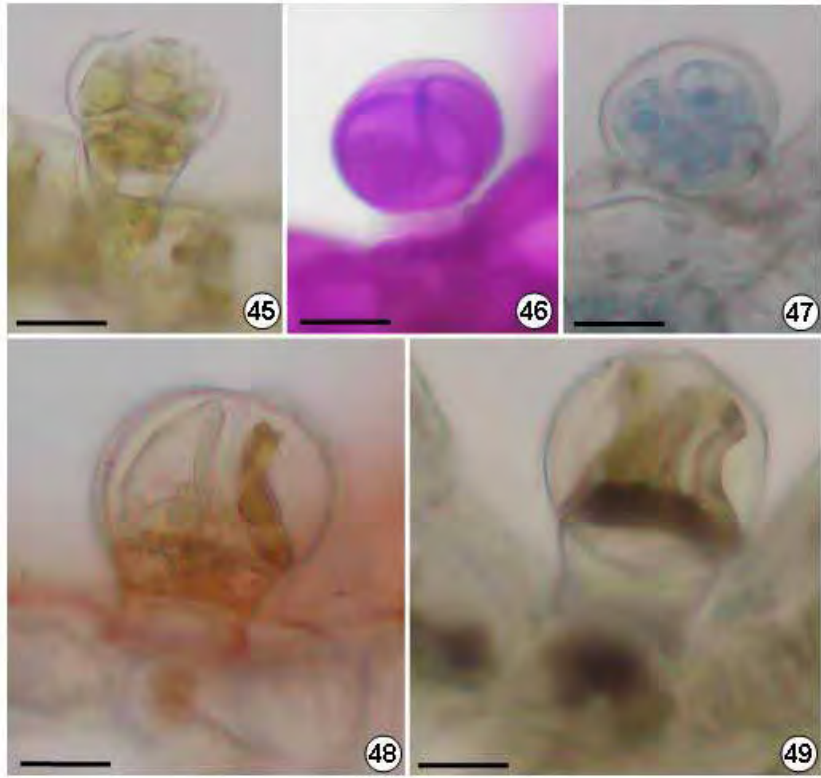


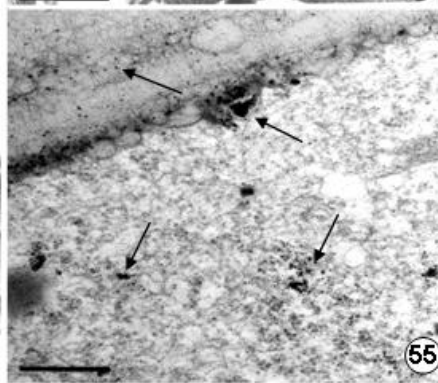
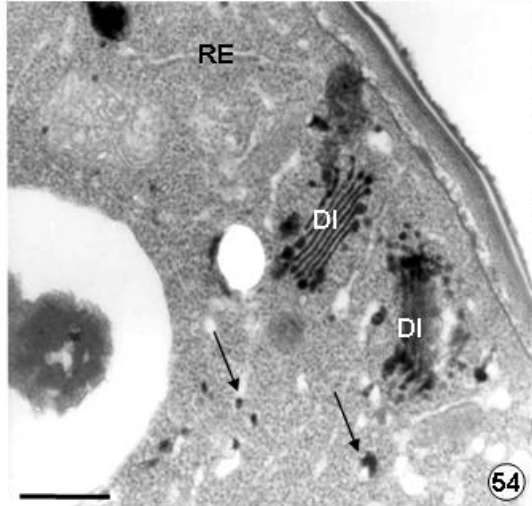
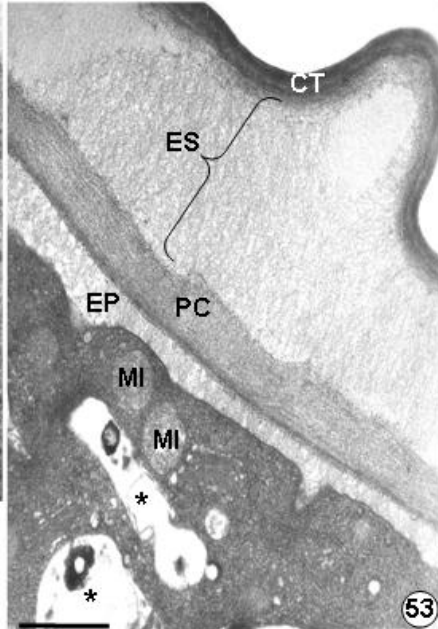
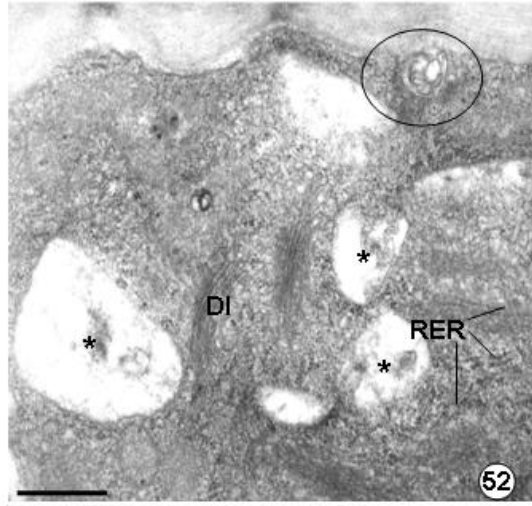
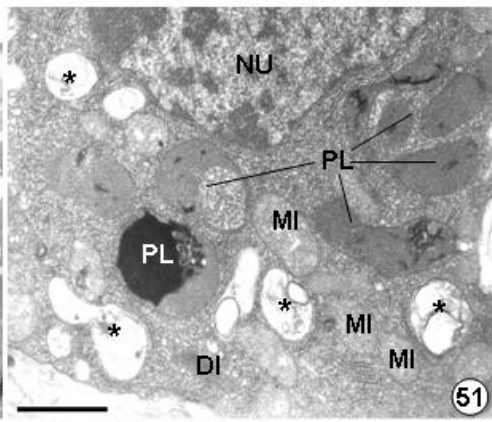
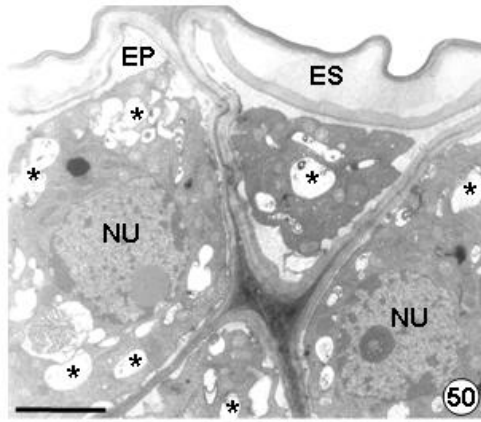


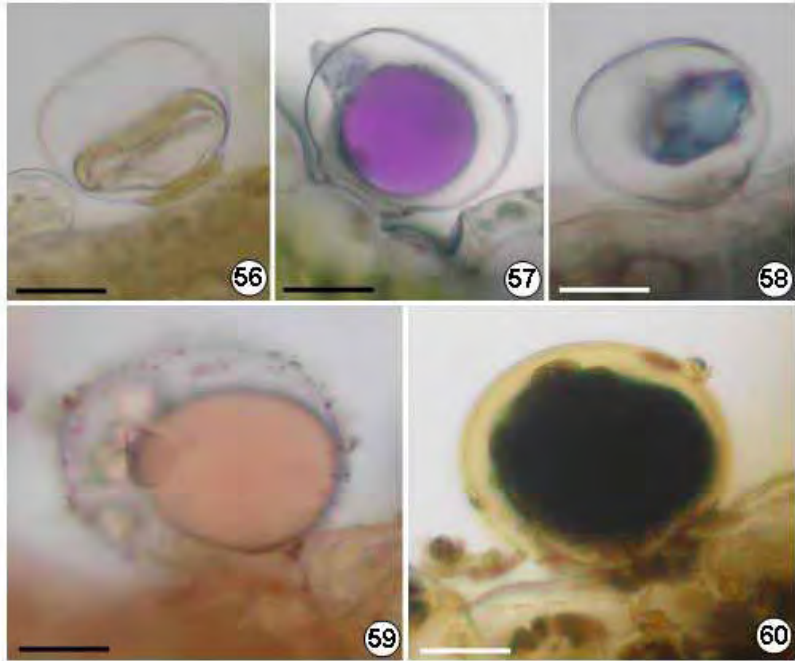


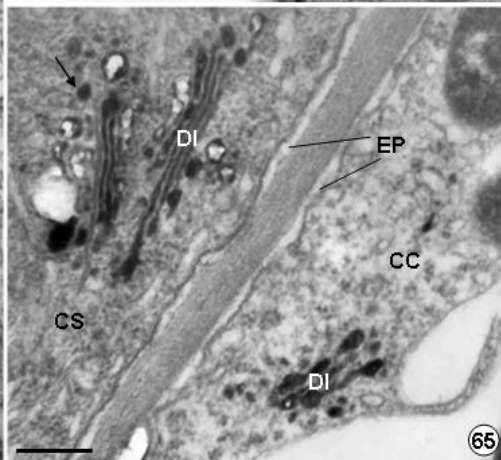
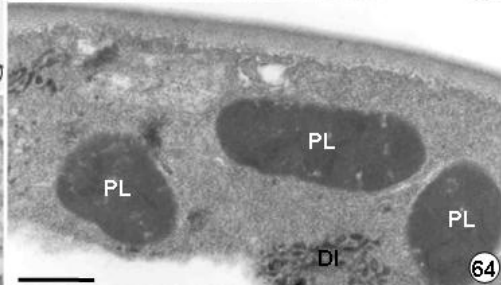
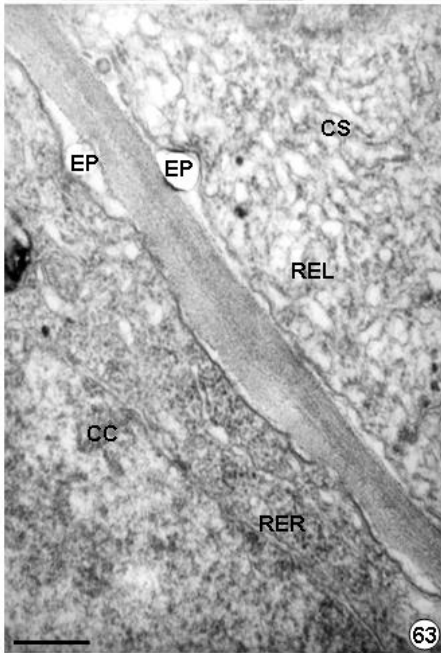
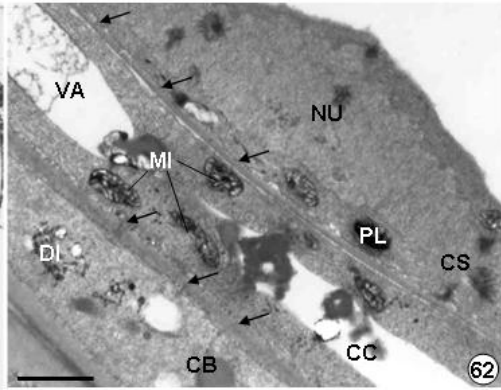
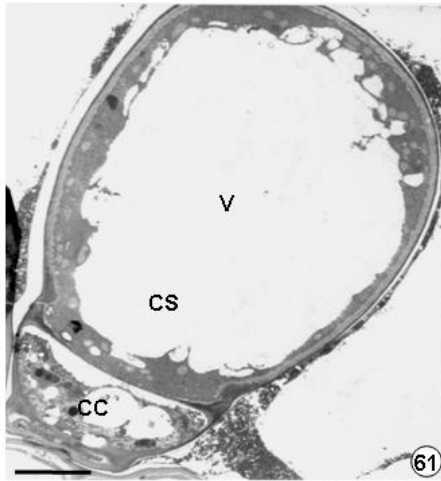


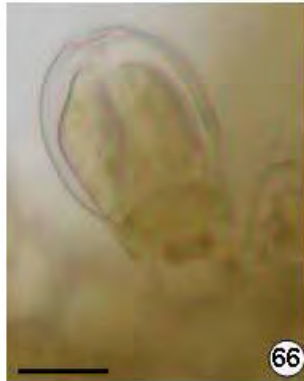












66



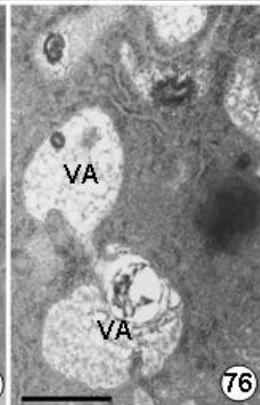
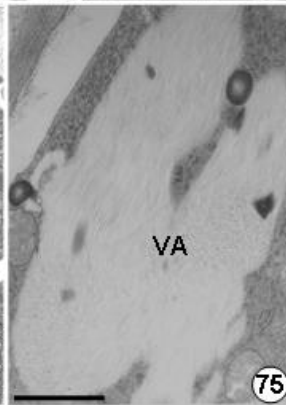
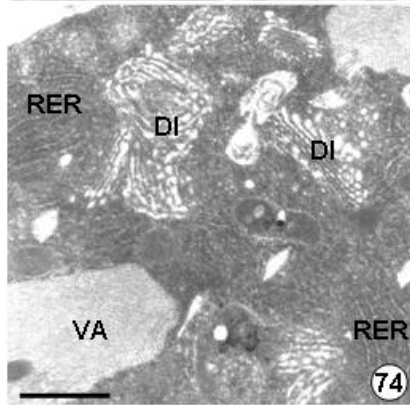
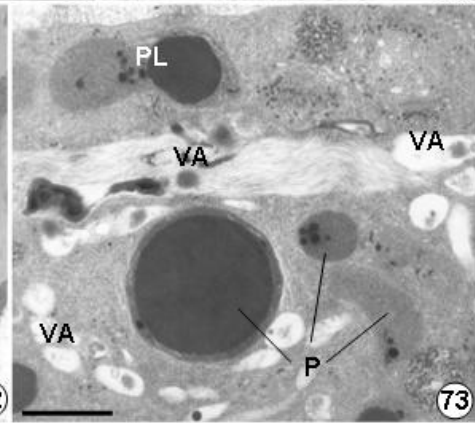
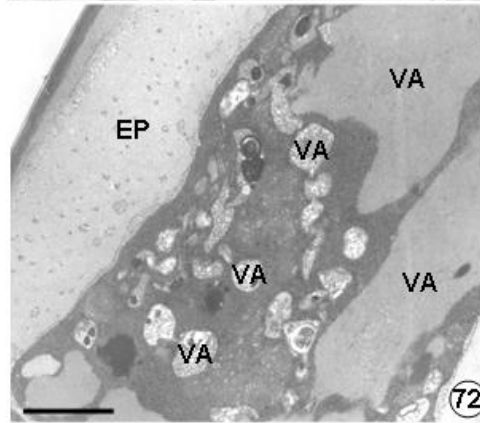
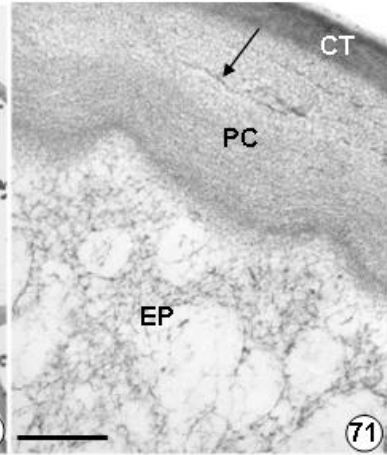
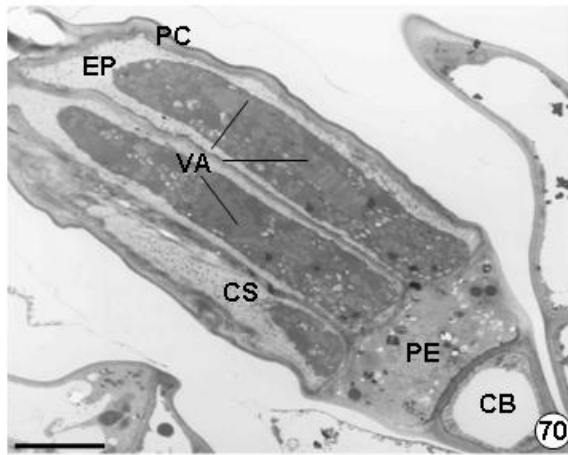
67



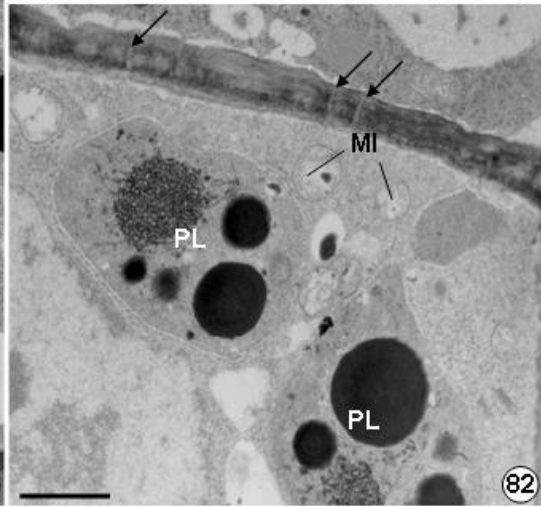
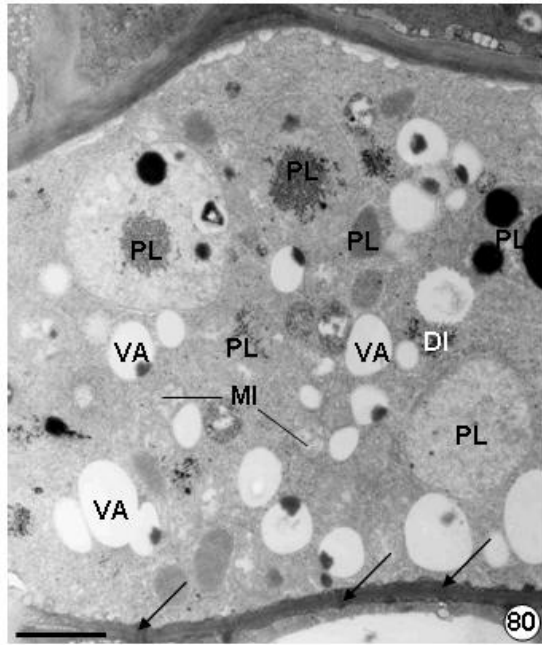
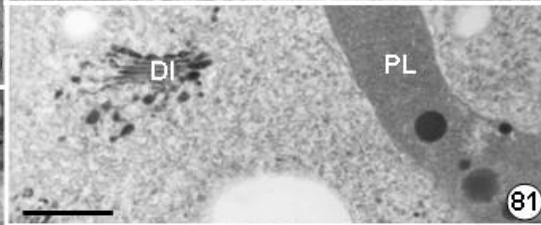
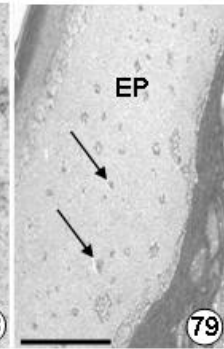
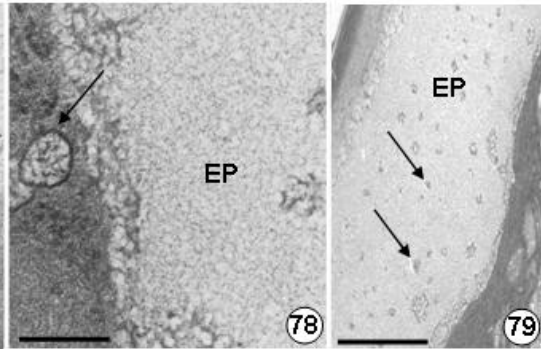
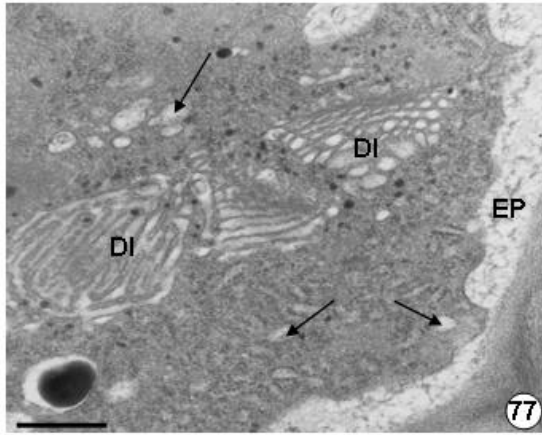
68

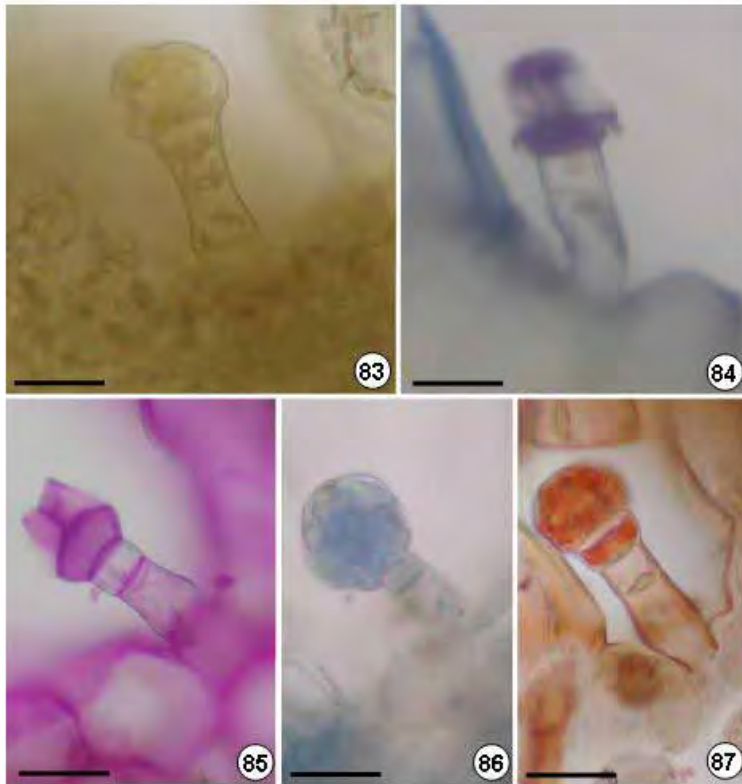


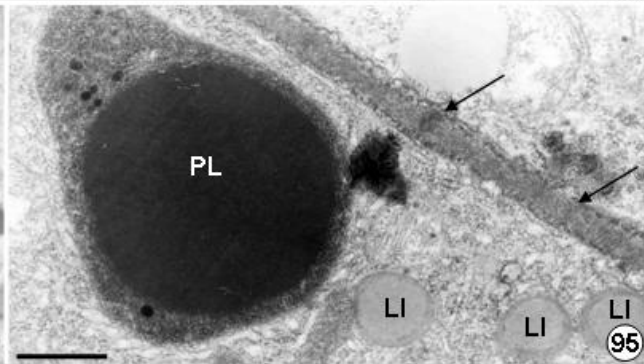
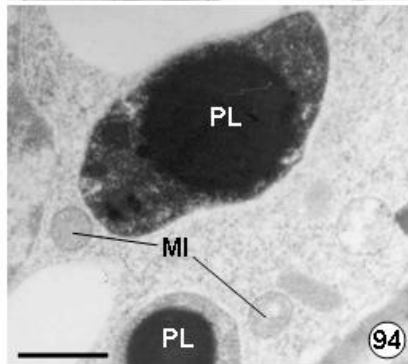
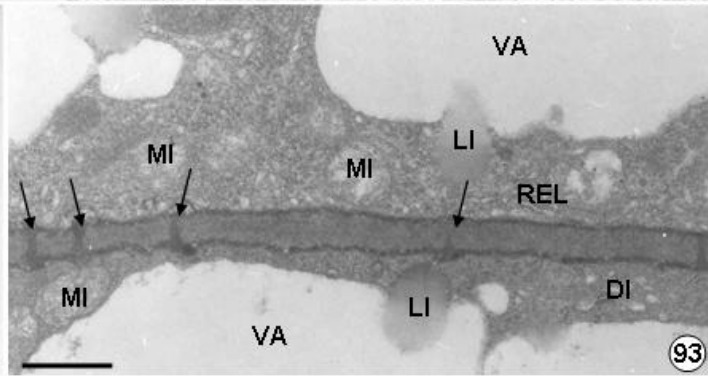
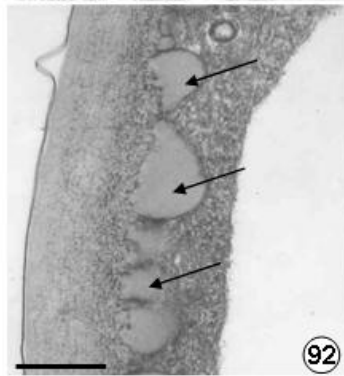
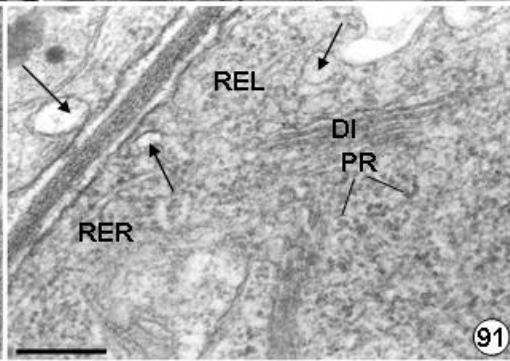
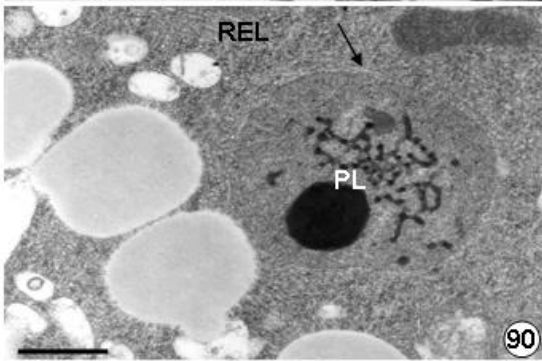
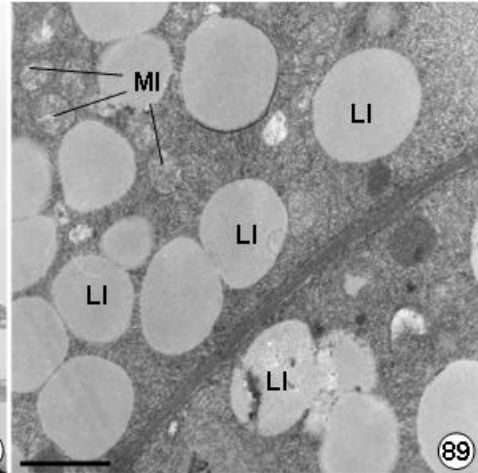
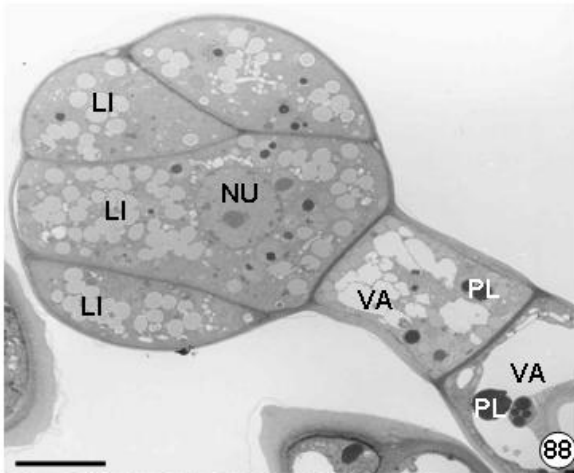
69











## Considerações finais

Este trabalho foi dedicado ao estudo dos tricomas secretores presentes em órgãos vegetativos e florais de *Lippia stachyoides*, aprofundando e complementando o conhecimento científico existente para as poucas espécies de *Lippia*. Das cerca de 200 espécies deste gênero, poucas foram estudadas com relação aos tricomas secretores, sendo que estudos pormenorizados compreendendo análises ontogenéticas, histoquímicas e ultra-estruturais são ainda muito raros. Na literatura disponível, nota-se que a falta de estudos detalhados e o uso de uma única técnica em vez de técnicas combinadas levam, muitas vezes, a interpretações equivocadas, dificultando a comparação dos nossos resultados com as espécies já estudadas.

A distinção de cinco tipos de tricomas secretores em *L. stachyoides* só foi possível graças ao uso de técnicas convergentes e análises integradas envolvendo aspectos da estrutura, ontogênese, histoquímica e ultra-estrutura dos mesmos. Com base em literatura, pode-se dizer que as variações observadas, provavelmente, estão associadas à composição química da secreção produzida pelos tricomas secretores. Análises do perfil químico da secreção dos tricomas individuais são necessárias para confirmar esta hipótese.

As análises ultra-estruturais e os testes citoquímicos empregados possibilitaram associar as características celulares com os resultados histoquímicos e compreender os mecanismos de secreção de cada tipo de tricoma.

Finalmente, este estudo mostrou que os tricomas secretores em *L. stachyoides* são sítios de síntese e acúmulo de substâncias de valor ecológico e medicinal, indicando a importância da preservação desta espécie e do habitat em que esta está inserida. Estudos

multidisciplinares são necessários para comprovar o potencial desta espécie como fonte de substâncias para as indústrias de fármacos, cosméticos e/ou produtos alimentícios.

## Referências Bibliográficas

- Aguiar, J.S. e Costa, M.C.C.D. (2005) *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **8**, 79-84.
- Albuquerque, J.N. (1989) *Plantas medicinais de uso popular*. Brasília. ABEAS/MEC, 96p.
- Andrighetti-Fröhner, C.R.; Sincero, T.C.M.; Silva, A.C.; Savi, L.A.; Gaido, C.M.; Bettega, J.M.R.; Mancini, M.; Almeida, M.T.R.; Barbosa, R.A.; Farias, M.R.; Barardi, C.R.M. e Simões, C.M.O. (2005) Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*. **76**, 374-8.
- Angermüller, S. e Fahimi, D.H. (1982) Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochemistry Journal*. **14**, 823-825
- Antunes, T.; Sevinato – Pinto, I.; Barroso, J.G.; Figueiredo, A.C.; Pedro, L.G.; Fontinha, S.S. e Scheffer, J.J.C. (1997) Morphology and distribution of trichomes in two endemic *Teucrium* species of Macaronesia. *Acta Botanica Gallica*. **144**, 363-369.
- Ascensão, L. e Pais, S.S. (1987) Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette*. **148**, 221-227.
- Ascensão, L. e Pais, M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany*. **81**, 263-271.
- Ascensão, L.; Marques, N. e Pais, M.S. (1995) Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **75**, 619-626.

- Ascensão, L.; Mota L. e Castro M.M. (1999) Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*. **84**, 437-447.
- Behnke, H.D. (1984) Plant trichomes - structure and ultrastructure: general terminology, taxonomic applications, and aspects of trichome-bacteria interaction in leaf tips of *Discorea*. In: Rodriguez, E.; Healey, P.L. e Metha, I. (1984) *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum Press, 95-112.
- Bisio, A.; Corillo, A.; Gastaldo, P.; Romussi, G.; Ciarallo, G.; Fontana, N.; Tommasi, N. e Profumo, P. (1999) Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegee ex epling grown in Italy. *Annals of Botany*. **83**, 441-452.
- Bonzani, N.E.; Filippa, E.M. e Barboza, G.E. (1997) Particularidades epidérmicas en algunas especies de Verbenaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. **68**, 47-56.
- Bonzani, N.E.; Filippa, E.M. e Barboza, G.E. (2003) Estudio anatomico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. **74**, 31-45.
- Bourett, T.M.; Howard, R.J.; O'Keefe, D.P. e Hallahan, D.L. (1994) Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *International Journal of the plant science*. **155**, 623-632.
- Caceres, A.; Alvarez, A. V.; Ovando, A. E.; Samayoa, B.E. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, **31**, 193-208.

- Camargo, R.C.R. (2001) Biologia floral de *Lippia alba* (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. *Tese de Doutorado*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, 99p.
- Campbell, N. e Thomson, W.W. (1976) The ultrastructure of *Frankenia* salt glands. *Annals of Botany*. **40**, 681-686.
- Castro, M.M. e Machado, S.R. (2006) Células e tecidos secretores. *In*: Apezatto-da-Glória, B. e Carmello-Guerreiro, S.M. eds. *Anatomia Vegetal*, Visçosa, UFV.
- Cheng, A.; Lou, Y.; Mao, Y.; Lu, S.; Wang, L. e Chen, X. (2007) Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. **49**, 179-786.
- Combrinck, S.; Du Plooy, G.W.; Mc Crindle, R.I. e Botha, B.M. (2007) Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany*. **99**, 1111-1119.
- Corrêa, M.P. (1984) *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: IBDF, **4**, 40: erva cidreira do campo.
- Corrêa, C.B.V. (1992) Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N. E. BR. ex Britt & Wilson – erva cidreira. *Revista Brasileira de Farmácia*. **3**, 57-64.
- Craveiro, A.A.; Fernandes, A.G.; Andrade, C.H.S.; Matos, F.J.A. e Alencar, J.W. (1981a) Essencial oils from Brazilian Verbenaceae Genus *Lippia*. *Journal of Natural Products*, **44**, 598-601.
- Craveiro, A.A.; Alencar, J.W.; Matos, F.J.A.; Fernandes, A.G. (1987) Contribuição a quimiotaxonomia do gênero *Lippia*. *In*: 39<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, *Ciência e Cultura*, São Paulo, **39**, 530.



- Croteau, R.; Kutchan, T.M. e Lewis, N.G. (2000) *Natural Products (Secondary Metabolites)*. In. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. Eds. American Society of Plant Physiologist.
- David, R. e Carde, J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*. **258**, 1338-1340.
- Di Stasi, L.C.; Santos, E.M.G.; Santos, C.M. e Hiruma, C.A. (1989) *Plantas medicinais da Amazônia*. São Paulo: UNESP, 65-6.
- Doaigey, A.R. (1991) Trichome type the genus *Otostegia* Benth. (Lamiaceae). 1. *O. fruticosa* var. *fruticosa* (Forssk.) Briq. and *O. fruticosa* var. *schimperii* (Boiss.) Tackh. *Journal King Saud University*. **3**, 23-30.
- Duarte, M.C.T.; Figueira G.M.; Sartoratto A.; Rehder V.L.G. e Delarmelina C. (2005) Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**, 305-311.
- Duke, S.O. (1994) Commentary; glandular trichomes – a focal point of chemical and structural interactions. *International Journal of Plant Sciences*. **155**, 617-620.
- Dwivedi, S.K. e Kishore, N. (1990) Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. *Indian Perfumer*. **34**, 20-1.
- Fahn, A. (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press. 301p.
- Fahn, A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New phytologist*. **108**, 229-257.
- Fahn, A. (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*. **31**, 37-75.

- Figueiredo, A.C. e Pais, M.S.S. (1994) Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Annals of Botany*. **74**, 179-790.
- Furr, M. e Mahlberg, P.G. (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*. **44**, 153-159.
- Gersbach, P.V. (2002) The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **89**, 255-260.
- Gomes, E.C.; Ming, L.C.; Moreira, E.A. e Miguel O.G. (1993) Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*. **74**, 29-32.
- Gonçalves, E.G. e Lorenzi, H. (2007) *Morfologia Vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. Instituto Plantarum de estudos da flora. 446p.
- Gonzalez, A.M. e Arbo, M.M. (2004) Trichome complement of *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **144**, 85-97.
- Gravano, E.; Tani, C.; Bennicci, A. e Gucci, R. (1998) The ultrastructure of glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) leaves. *Annals of Botany*. **81**, 327-335.
- Grubestic, R.J.; Vladimir-Knezevic, S.; Kremer, D.; Kalodera, Z. e Vukovic, J. (2007) Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing Croatia. *Biologia, Bratislava*. **62**, 148-156.
- Guignard, J.L. e Dupont, F. (2004) *Botanique systématique moléculaire*. Masson, Paris. 13<sup>o</sup> ed.

- Hassan, M.A. e Begum, S. (2001) Taxonomic significance of foliar trichomes of some species of Verbenaceae from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, Dhaka. **30**, 75-78.
- Inamdar, J.A. (1969) Epidermical structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. *Annals of Botany*. **33**, 55-66.
- Jensen, W.A. (1962) *Botanical histochemistry: principle and practice*. San Francisco: W.H Freeman. 408p.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant micro technique*. New York: McGraw-Hill, 523p.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. e Stevens, P.F. (1999) *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates , Inc. USA. 349p.
- Julião *et al.*, 2001. In: Biasi, L.A. e Costa, G. (2003) Propagação vegetativa de *Lippia alba*. *Ciência rural*. **33**, 455-459.
- Kamatou, G.P.P.; Viljoen, A.M.; Figueiredo, A.C.; Tilney, P.M.; Van Zyu, R.L.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. e Van Vuuren, S.F. (2007) Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the cape region of South African. *South African Journal of Botany*. **73**, 102-108.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electrón microscopy. *Journal of Cell Biology*. **27**, 137 - 138.
- Kaya, A.; Demirci, B. e Baser, K.H.C. (2007) Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. e Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany*. **73**, 29-34.
- Kishore, N. e Mishra, A. K. (1991) Effect of essential oils on sclerotial germination of *Rhizoctonia solani*. *National Academy Science Letters*. **14**, 239-40.

- Kishore, N.; Dubey, N. K. e Mishra, A. K. (1993) Efficacy of essential oils against fungi causing deterioration of *Triticum aestivum* during storage. *Indian Journal of Microbiology*. **33**, 277-80.
- Krstic, L.; Malencic, D. e Anackov, G. (2006) Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Botanica Helvetica*. **116**, 159-168.
- Leal, L.K.A.M.; Oliveira, V.M.; Araruna, S.M.; Miranda, M.C.C. e Oliveira, F.M.A. (2003) Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **13**, 09-11.
- Levin, D.A. (1973) The role of trichomes in plant defense. *The quarterly review of biology*. **48**, 3-15.
- Liakoura, V.; Stefanou, M.; Manetas, Y.; Cholevas, C. e Karabourniotis, G. (1997) Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and Experimental Botany*. **38**, 223-229.
- Machado, S.R.; Gregório, E. A. e Guimarães, E. (2006) Ovary peltate trichomes of *Zeyheria Montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany*. **97**, 357-369.
- MacRae, E.K. e Meetz, G.D. (1970) Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. *Journal Cell. Biology*. **45**, 235-245.
- Maffei, M.; Chialva, F. e Sacco, T. (1989) Glandular trichomes and essential oil in developing *peppermint* leaves. *New Phytologist*. **111**, 707-716.
- Marin, M.; Koko, V.; Duletic-Lausevic, S.; Marin, P.D.; Ranile, D. e Dajic-Stevanovic, Z. (2006) Glandular trichomes on leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*. **72**: 378-382.

- Martins, M.B.G. e Pastori, A.P. (2004) Anatomia foliar com ênfase nos tricomas secretors e análise cromatográfica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **6**, 77-82.
- Mattos, A.F.J.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W. e Abreu Mattos, F.J. (1996) Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *Journal of Essential Research*. **8**, 695-698.
- McIlvaine, T.C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal Biology and Chemistry*. **49**, 183–186.
- McManus, J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. **23**: 99-108.
- Metcalf, C.R. e Chalk, L. (1950) *Anatomy of the dicotyledons II*. Clarendon, Oxford. 1500p.
- Mevy, J.P.; Bessiere, J.M.; Dherbomez, M.; Millogo, J. e Viano, J. (2007) Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of chemotipy of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chemistry*. **101**, 682-685.
- Ming, L.C. (1992) Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (MILL) N. E. Br. Verbenaceae. *Dissertação (Mestrado)* em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 206 p.
- Moldenke, H.N. (1965) Materials toward a monograph of the genus *Lippia*. I. *Phitologia*. Plainfield. **12**, 6 – 71.
- Navarro, T. e Qualidi, J. (2000) Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Anales Jardín Botánico de Madrid*. **57**, 277-297.

- Nunes, R.S.; Xavier, H.S.; Rolim Neto, P.J.; Santana, D.P. e Albuquerque, U.P. (2000) Botanical standardization of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, La Plata. **19**, 115-118.
- Nunes, R.S.; Lira, A.M.; Ximenes, E.; Silva, J.A. e Santana, D.P. (2005) Caracterização de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) como matéria-prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. *Scientia Plena*. **1**, 182-184.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. e Cully, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O protoplasma*. **59**, 369-376.
- Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S. e Leitão, G.S. (2007) Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry*. **101**, 236-240.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D. e Villar, A. (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**, 201-214.
- Payne, W.W. (1978) A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*. **30**, 239-255.
- Peres, L.E.P. (2004) *Metabólitos Secundários*. Apostila.
- Pérez, S.; Meckes, M.; Pérez, C.; Susunaga, A. e Zavala M.A. (2005) Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **102**, 1-4.
- Pimenta, M.R.; Fernandes, L.S.; Pereira, U.J.; Garcia, L.S.; Leal, S.R.; Leitão, S.G.; Salimena, F.R.; Viccini, L.F. e Peixoto, P.H.P. (2007) Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. **30**, 211-220.
- Reinecke, M. e Walther, C. (1978) Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. *Journal of Cell Biology*. **21**, 839-855.

- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. **17**, 208.
- Robards, A.W. (1978) An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J.L. Hall (eds.). New York, Elsevier.
- Sachetti, G.; Romagnoli, C.; Nicoletti, M.; Di Fabio, A.; Bruni, A. e Poli, F. (1999) Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. *Annals of Botany*. **83**, 87-92.
- Salimena, F.R.G. (2002) Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* SCT. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*. **40**, 121-125.
- Sano, S.M. e Almeida, S.P. (1998) *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.556p.
- Santos, M.R.A.; Innecco, R. e Soares, M.A. (2004) Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. *Revista Ciência Agronômica*. **35**, 377-383.
- Serrato-Valenti, G.; Bisio, A.; Cornara, L. e Ciarallo, G. (1997) Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*. **79**, 329-336.
- Sharma, S.; Sangwan, N.S. e Sangwan, R.S. (2003) Developmental processo f essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science*. **84**, 544-550.
- Silva, J.B. 1979. Novo método de extração de óleo essencial de *Lippia citriodora* (K.) do Rio Grande do Sul. *Tribuna Farmacêutica*. **4**, 6-8.

- Souza, V.C. e Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática: um guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Souza, M.F.; Gomes, P.A.; Souza Júnior, I.T.; Fonseca, M.M.; Siqueira, C.S.; Figueiredo, L.S. e Martins, E.R. (2007) Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). *Revista Brasileira de Biociências*. **5**, 108-110.
- Toledo, M.G.T.; Alquini, Y. e Nakashima, T. (2004) Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **40**, 487-493.
- Turner, G.W.; Gershenzon, J. e Croteau, R.B. (2000) Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant physiology*. **124**, 655-663.
- Uphof, J.C. (1962) *Plant hairs*. Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin: Gebrüder Borntraeger. Band IV (5).
- Viljoen, A. M.; Subramoney, S.; Van Vuuren, S.F.; Baser, K.H.C. e Demirci, B. (2004) The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**, 271-277.
- Wagner, G.I.; Wang, E. e Shepherd, W. (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*. **93**, 3-11.
- Wagner, G.J. (1991) Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiologist*. **96**, 675-679.
- Werker, E. e Fahn, A. (1981) Secretory hairs os *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure, and secretion. *Botanical Gazette*. **142**, 461-476.



Werker, E.; Putievsky, E. e Ravid, U. (1985) The essential oils and glandular hairs and in different chemotypes of *Origanum vulgare* L.. *Annals of Botany*. **55**, 793-801.

Werker, E (1993) Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – a review. *Flavour and Fragrance Journal*. **8**, 249-255.

Werker, E.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N. e Katzir, I. (1993) Glandular hair and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **71**, 43-50.

Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L D. e Maia, J.G.S. (2002) Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**, 29-31.