

EMANUELLE OLIVEIRA ARAÚJO

**DESEMPENHO FENOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE
GERVÃO-ROXO *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)**

**Botucatu
2020**

EMANUELLE OLIVEIRA ARAÚJO

**DESEMPENHO FENOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE
GERVÃO-ROXO *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)**

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Horticultura).

Orientador (a): Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim

Co-orientador (a): Prof. Dr. Luiz Ricardo dos Santos Tozin

Botucatu

2020

A663d

Araújo, Emanuelle Oliveira

Desempenho fenológico e caracterização anatômica de gervão-roxo
Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl (Verbenaceae) / Emanuelle
Oliveira Araújo. -- Botucatu, 2020

65 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim

Coorientador: Luiz Ricardo dos Santos Tozin

1. Plantas Medicinais. 2. Fenologia. 3. Anatomia Vegetal. 4.
Histoquímica. 5. Fenóis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESEMPENHO FENOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE GERVÃO-ROXO *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)

AUTORA: EMANUELLE OLIVEIRA ARAÚJO

ORIENTADOR: FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

COORIENTADOR: LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM
Horticultura / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP

Professora Substituta ANGÉLICA LINO RODRIGUES
Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof.^a Dr.^a JORDANY APARECIDA DE OLIVEIRA GOMES 
Pós-Doutoranda - Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agrônômico de Campinas

Botucatu, 17 de fevereiro de 2020

*A Deus e Nossa Senhora,
e a minha amada família.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por renovar a minha fé e me permitir a realização de mais um sonho.

À Nossa Senhora, por sua intercessão, proteção e acalento.

Aos meus queridos pais Elisângela e Manoel e minha irmã Gabryele, pelo apoio incondicional e por serem alicerces firmes durante toda a minha caminhada.

A minha avó Bela, meus tios, primos e familiares, por suas orações constantes e incentivo na realização dos meus sonhos.

À Rafael, por todo zelo, carinho e compreensão, por sonhar meus sonhos junto comigo, por me incentivar a ser sempre uma pessoa melhor e por todas as orações partilhadas.

Ao Prof. Dr. Filipe, pela orientação, ensinamentos, paciência, por ser exemplo de professor e pela confiança em mim e no trabalho que desenvolvemos.

Ao Prof. Dr. Ricardo, pela co-orientação, por partilhar comigo seu conhecimento, por toda paciência, cuidado e me mostrar as plantas por outra ótica deslumbrante.

Aos todos os meus amigos de fé, em especial a Maryanna e Amanda por tornar a caminhada mais leve e engraçada e serem porto seguro.

Aos amigos Isabella, Sara, Júlio e Isabelly por tornar a mudança algo tão agradável, pela amizade e companheirismo e pela valiosa ajuda no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Ernane, por ser exemplo de profissional e de ser humano, por me apresentar o universo das plantas medicinais e permitir aprender muito além da sala de aula.

À Jordany, Daniela e aos estagiários do Grupo de Pesquisa em Horticultura Orgânica e Biodiversidade, pela ajuda nas etapas do trabalho.

Ao departamento de Horticultura e a FCA pela estrutura física e humana disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

“A natureza dá a cada época e estação algumas belezas peculiares; e da manhã até a noite, como do berço ao túmulo, nada mais é que uma sucessão de mudanças tão gentis e suaves que quase não conseguimos perceber os seus progressos”.

Charles Dickens

RESUMO

Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl é conhecida popularmente como gervão-roxo, utilizada na medicina popular por sua ação estomáquica, antipiréticos, doenças hepáticas crônicas, e por sua utilização na indústria na composição de um fitomedicamento para o tratamento do vitiligo. A ação terapêutica das plantas medicinais muitas vezes está atrelada a produtos de seu metabolismo secundário, sendo este influenciado diretamente por diversos fatores bióticos e abióticos. Diante disso, a aplicação de ferramentas que visem compreender a dinâmica de resposta das plantas e o ambiente faz-se necessária afim de fornecer subsídio para o cultivo e domesticação destas espécies. Dentre estas ferramentas está a fenologia, que avalia a resposta da planta a mudanças climatológicas, a anatomia que descreve a estrutura interna e a histoquímica que identifica e localiza as classes de compostos produzidos. Desse modo, o estudo teve como objetivo avaliar a resposta fenológica em resposta ao ambiente e a caracterização anatômica e histoquímica em *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. O experimento foi realizado na área experimental do Departamento de Horticultura da Fazenda Experimental Lageado na Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, em Botucatu-SP. Foram avaliados 52 indivíduos mensalmente de setembro/2018 a agosto/2019 quanto a resposta fenológica da espécie em relação as variações climáticas. Além disso, as folhas e flores foram coletadas, fixadas e analisadas quanto a sua anatomia e histoquímica dos metabólitos produzidos. A espécie apresentou alta sincronia para as fenofases durante os meses de avaliação. A precipitação foi o fator que mais influenciou na resposta fenológica da espécie. A senescência apresentou correlação negativa com os fatores avaliados. Houve correlação entre temperatura e floração. Anatomicamente, o limbo foliar apresentou epiderme uniestratificada, com estômato e tricomas glandulares e tectores em ambas as faces e mesofilo dorsiventral. As flores apresentaram corola tubulosa, pentâmera, gamopétalas, com epiderme papilosa e paredes lignificadas com presença de tricomas tectores e glandulares. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos fenólicos em todo mesofilo, epiderme e tricomas, e nas flores; gotículas de óleo essencial foram identificadas no mesofilo foliar. O teor de compostos fenólicos encontrados foi superior ao encontrado na literatura. Quanto a

anatomia, a espécie foi influenciada pelos fatores climáticos avaliados, principalmente a precipitação. A descrição anatômica das flores não foi encontrada na literatura, bem como os elevados teores de compostos fenólicos.

Palavras-chaves: Anatomia foliar. Fenologia. Histoquímica. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl is popularly known as purple gervão, used in folk medicine for its stomatal action, antipyretics, chronic liver diseases, and for its use in industry in the composition of a phytomedicine for the treatment of vitiligo. The therapeutic action of medicinal plants is often linked to products of their secondary metabolism, which is directly influenced by several biotic and abiotic factors. Therefore, the application of tools that aim to understand the response dynamics of plants and the environment is necessary in order to provide support for the cultivation and domestication of these species. Among these tools is phenology, which assesses the plant's response to climatological changes, the anatomy that describes the internal structure and the histochemistry that identifies and locates the classes of compounds produced. Thus, the study aims to evaluate the phenological response in response to the environment and the anatomical and histochemical characterization in *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. The experiment was carried out in the experimental area of the Horticulture Department of Fazenda Experimental Lageado at the Faculty of Agronomic Sciences of Universidade Estadual Paulista, in Botucatu-SP. 52 individuals were evaluated monthly from September / 2018 to August / 2019 for the phenological response of the species in relation to climatic variations. In addition, the leaves and flowers were collected, fixed and analyzed for their anatomy and histochemistry of the metabolites produced. The species showed high synchrony for the phenophases during the months of evaluation. Precipitation was the factor that most influenced the phenological response of the species. Senescence showed a negative correlation with the factors evaluated. There was a correlation between temperature and flowering. Anatomically, the leaf blade presented a uni-stratified epidermis, with stoma and glandular and trichome trichomes on both sides and dorsiventral mesophyll. The flowers presented tubular corolla, pentamera, gamopetals, with papillary epidermis and lignified walls with the presence of tector and glandular trichomes. Histochemical tests showed the presence of phenolic compounds in all mesophyll, epidermis and trichomes, and in flowers; droplets of essential oil were identified in the leaf mesophyll. The content of phenolic compounds found was higher than that found in the literature. As for anatomy, the species was influenced by the climatic factors evaluated, mainly the precipitation. The anatomical

description of the flowers was not found in the literature, as well as the high levels of phenolic compounds.

Keywords: Leaf anatomy. Phenology Histochemistry. Medicinal plants.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 - DESEMPENHO FENOLÓGICO DE GERVÃO-ROXO <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl (Verbenaceae)	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
1.4 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2- ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DAS FOLHAS E FLORES DE <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl (Verbenaceae)	37
2.1 INTRODUÇÃO.....	39
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
2.4 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de recursos da biodiversidade para tratamentos, prevenção e cura de doenças por meio do emprego de plantas com fins medicinais, tem acompanhado a evolução da humanidade com o passar dos anos. O uso dessas espécies oriundas do conhecimento popular, desencadeou estudos que verificassem e comprovassem a ação farmacológica das espécies e por meio da identificação dos princípios ativos e seu modo de atuação no organismo (FERNANDES *et al.*, 2019).

Segundo o Ministério da Saúde (2014) as plantas medicinais podem ser definidas como aquelas que seja toda ou em parte utilizada para fins terapêuticos, provinda de ambiente nativo ou de locais de cultivo. Cada vez mais estas plantas vêm sendo estudadas afim de fomentar o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, no entanto, há uma defasagem nas informações técnicas a respeito da qualidade, eficácia e segurança no uso de grande parte das espécies medicinais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; FIRMO, 2011).

Dentre as muitas famílias de espécies medicinais, Verbenaceae compreende cerca de 34 gêneros (STEVENS, 2010) e no Brasil ocorrem cerca de 286 espécies das quais 183 são endêmicas, sendo muitas delas empregadas na medicina popular, como *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (FLORA DO BRASIL, 2020). Esta espécie, conhecida popularmente como gervão-roxo, gervão, richão, vassorinha de botão (PIO CORREA, 1926; ALMEIDA, 1993), é originária da América Tropical, e é encontrada na Austrália, Havaí e Índia sendo nativa do continente Americano, em especial do Brasil, onde está amplamente distribuída do norte ao sul do país (ATKINS, 2005).

Algumas divergências são encontradas quando a sua classificação. Segundo Pio Correa (1984) é classificada como arbusto, podendo atingir até 2,5 m de altura, muito ramificado e com os ramos ligeiramente pilosos ou glabrescentes; suas folhas podem variar de ovadas até elípticas com até 7 cm de comprimento, serradas ou cuneado-serradas, apresenta flores azul-pálido ou roxas, de 5 mm, dispostas em espigas flexuosas de 25 cm ou menos; brácteas estreito-lineares, acuminado setáceas; cálice curto, comprimido. Entretanto, Lorenzi e Matos (2002) classificam-na como subarbusto anual ou perene, ereto, muito ramificado, de 70-100 cm de

altura, com inflorescências terminais espigadas, com poucas flores de coloração azul.

A espécie apresenta composição química variável com a presença de grupos como alcaloides, glicosídeos (verbenalina e verbenina), saponinas, esteroides, quinonas, compostos fenólicos (taninos, flavonoides) e ácido glicogênico (HAMMER, 1993; LORENZI; MATOS, 2002). Sendo por isso empregada para diversos usos medicinais, de toda a sua parte aérea como antipiréticos, estomáquicos, no tratamento de doenças hepáticas crônicas e com diversas outras finalidades como no tratamento de estados gripais, apresentando ação febrífuga, antitussígena, antitérmica e sudorípara como infusos, chá ou tinturas (BALBACH, 1986; CAITANO, 1996), bem como o sistema radicular utilizado como cicatrizantes e como atenuantes de dores reumáticas (BLANCO *et al.*, 2005). Além disso, o interesse na espécie vem crescendo pela ação do extrato da planta como um dos componentes de um fitomedicamento para tratamento de vitiligo, devido a sua ação cicatrizante e anti-inflamatória, atuando como protetor da melanina presente na pele, através do seu encapsulamento, fazendo com que a mesma esteja protegida da degradação, reduzindo a despigmentação (FERREIRA, 2010).

Todavia, pouco se sabe sobre o comportamento desta espécie tanto em ambiente nativo como em sistemas de cultivo. Assim como suas respostas fenológicas a fatores climáticos externos como temperatura, umidade relativa e precipitação, e como estes fatores podem influenciar na dinâmica interna da espécie, desde a sua anatomia até seu metabolismo. Diante disso, faz-se necessário o emprego de ferramentas que visem fornecer informações sobre a espécie em resposta a variáveis climatológicas para que se tenham informações sobre o processo de domesticação e cultivo.

A fenologia é tida como ferramenta para que os cultivos de espécies de interesse sejam bem-sucedidos, uma vez que fornece dados para compreender a resposta dos processos fenológicos de uma espécie a mudanças climatológicas. Essa análise permite o entendimento do ciclo da planta e como esta poderá responder a diferentes manejos aplicados, fornecendo indicadores de resposta em determinada área como aumento e/ou redução do número de folhas, início de fenofase, dentre outros, pois podem haver variações climáticas no mesmo ambiente (FOURNIER, 1974; D'EÇA NEVES; MORELLATO, 2004). Entretanto, ainda não foram encontrados dados fenológicos para esta espécie na literatura.

Sabe-se que a biossíntese de metabólitos secundários pelas espécies medicinais é influenciada por diversos fatores como sazonalidade, horário de coleta, temperatura, disponibilidade hídrica, dentre outros. Sendo necessário a realização de estudos, que visem fornecer estratégias de manejo, que possam ser adotados a cada região de interesse em cultivo, de forma a compreender a dinâmica vegetal interna em resposta a fatores externos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O estudo anatômico, atrelado aos testes histoquímicos podem fornecer informações relevantes sobre os locais de síntese de diferentes compostos químicos, bem como quais classes químicas de compostos estão sendo produzidas por determinada espécie. Com estes dados, podemos fazer inferências ecológicas sobre o papel de determinada estrutura ou tecido, e da respectiva secreção produzida por ele (SILVA *et al.*, 2016; TOZIN; RODRIGUES, 2019), além de fornecer subsídios para a indústria farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia. Para o gervão-roxo, IDU *et al.* (2009) relatam algumas características da epiderme, tricomas e outras estruturas, bem como a natureza histoquímica dos compostos produzidos que não foram encontrados na literatura.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta fenológica em resposta ao ambiente e a caracterização anatômica e histoquímica em *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, de forma a oferecer parâmetros que possam dar subsídio ao manejo da espécie.

CAPÍTULO 1

DESEMPENHO FENOLÓGICO DE GERVÃO-ROXO *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)

RESUMO

A fenologia é ferramenta importante para a domesticação das espécies, pois permite avaliar a resposta da planta de interesse, no ambiente na qual está inserida. *Stachytarpheta cayennensis* é uma espécie medicinal empregada como estomáquica, cicatrizante, para dores reumáticas, dentre outras. A caracterização das fenofases permite que o manejo na área de cultivo seja mais eficiente pois viabiliza compreendê-las melhor em resposta ao ambiente. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo acompanhar e descrever a fenologia de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, com o intuito de obter informações importantes para a domesticação e também analisar a influência dos fatores climáticos nas fenofases, além de determinar a ocorrência de sincronia nas fenofases. Foram acompanhados 52 indivíduos mensalmente em área de cultivo sem interferências de manejo, no período de setembro de 2018 a agosto de 2019, e foram analisadas quanto à intensidade e sincronia das fenofases de brotamento, folhas maduras, senescência foliar, floração e frutificação. *Stachytarpheta cayennensis* se mostrou altamente sincrônica para as fenofases durante o período de avaliação. A temperatura e a precipitação foram os fatores abióticos que mais influenciaram no comportamento fenológico. O pico de floração da espécie foi de janeiro a abril, e a senescência foliar chegou a 90% nos meses de junho e julho, a frutificação foi de janeiro a março e o pico de folhas maduras foi em junho. Para a fenofase senescência todos os fatores abióticos apresentaram correlação negativa. Portanto, a espécie é altamente sincrônica para as fenofases. Há correlação entre os fatores ambientais e as fenofases avaliadas. A fenofase floração apresentou-se de forma contínua para a área de estudo e possui alta correlação com a temperatura. Períodos ambientais de baixas temperaturas promove senescência foliar intensa. A precipitação tem influência direta com o início das fenofases avaliadas.

Palavras-chaves: Plantas medicinais. Fenofases. Sincronia. Fatores climáticos.

ABSTRACT

Phenology is an important tool for the domestication of species, as it allows to evaluate the response of the plant of interest, in the environment in which it is inserted. *Stachytarpheta cayennensis* is a medicinal species used as a stoma, healing, for rheumatic pain, among others. The characterization of phenophases allows the management in the cultivation area to be more efficient because it makes it possible to understand them better in response to the environment. Thus, the present study aimed to monitor and describe the phenology of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, in order to obtain important information for domestication and also to analyze the influence of climatic factors on phenophases, in addition to determining the occurrence of synchrony in phenophases. 52 individuals were monitored monthly in a cultivation area without management interference, from September 2018 to August 2019, and were analyzed for the intensity and synchrony of budding phenophases, mature leaves, leaf senescence, flowering and fruiting. *Stachytarpheta cayennensis* was shown to be highly synchronous for phenophases during the evaluation period. Temperature and precipitation were the abiotic factors that most influenced phenological behavior. The flowering peak of the species was from January to April, and the leaf senescence reached 90% in the months of June and July, the fruiting was from January to March and the peak of mature leaves was in June. For senescence phenophase, all abiotic factors showed a negative correlation. Therefore, the species is highly synchronous for phenophases. There is a correlation between the environmental factors and the evaluated phenophases. The flowering phenophase presented itself continuously for the study area and has a high correlation with temperature. Low temperature environmental periods promote intense leaf senescence. The precipitation has a direct influence with the beginning of the evaluated phenophases.

Keywords: Medicinal plants. Phenophases. Synchronism. Climatic factors.

1.1 INTRODUÇÃO

Stachytarpheta cayennensis é nativa do continente americano, amplamente distribuída do norte ao sul do Brasil (ATKINS, 2005). Apresenta diversos nomes

populares, dentre eles gervão-roxo, gervão, richão e vassorinha de botão (PIO CORREA, 1926; ALMEIDA, 1993). Recebe esta denominação por possuir inflorescências terminais espigadas, com poucas flores de coloração lilás, roxas até tons de azul (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie é amplamente empregada na medicina popular, por conter substâncias presentes em sua parte aérea que atuam como antipiréticos (LORENZI, 2000; BLANCO *et al.*, 2005), estomáquicos, no tratamento de doenças hepáticas crônicas (PENIDO *et al.*, 2006), atividade leshimanicida (MAQUIAVELI *et al.*, 2016), anti-inflamatória (SHAPOVAL *et al.*, 1998; PENIDO *et al.*, 2006), imunomoduladora (OKOYE *et al.*, 2014), anti-diabética (ADEBAJO *et al.*, 2007), antimalárica, e suas raízes também são usadas como cicatrizantes e como atenuantes de dores reumáticas (LORENZI, 2000; BLANCO *et al.*, 2005).

Além do uso popular, pesquisas demonstraram uso de três espécies do gênero *Stachytarpheta* na composição de um fitomedicamento de uso oral ou tópico, de forma isolada e/ou por meio de combinações de espécies do mesmo gênero no tratamento de vitiligo, e dentre as espécies avaliadas está *S. cayennensis*. Em testes clínicos os resultados foram positivos pois os pacientes apresentaram melhoras significativas na despigmentação ocasionada pela doença. A ação está relacionada a proteção da melanina presente no tecido, impedindo-a de ser degradada (FERREIRA, 2010).

Segundo Castro *et al.* (2007) o termo fenologia vegetal pode ser definida como o estudo de fenômenos biológicos naturais que ocorrem de forma cíclica em resposta principalmente ao clima no qual a espécie está submetida, observando, em que época as mesmas podem ocorrer, sendo este estudo de suma importância para definir a frequência e intensidade das fenofases e sua relação como o ambiente. O emprego desta ferramenta, permite ainda, a compreensão do caráter adaptativo da espécie em determinada região, através da identificação dos fenômenos vegetais nas suas formas e intensidades, permitindo a compreensão do ciclo anual da espécie (ANDREIS *et al.*, 2005).

Diante disso, é considerada uma ferramenta importante para que os cultivos de espécies sejam bem-sucedidos, pois fornece dados para compreensão da resposta dos processos fenológicos de uma espécie a mudanças climatológicas. Uma vez que, em cada ambiente pode haver variações de temperatura, radiação, umidade, precipitação, dentre outras. Essa ferramenta permite o entendimento do ciclo da

planta e como responde a diferentes manejos aplicados, fornecendo indicadores de resposta em uma determinada área (FOURNIER, 1974; D'EÇA NEVES; MORELLATO, 2004).

Além dos fatores relacionados diretamente à espécie, compreender as variações climáticas de uma determinada região é de suma importância pois esta pode influir diretamente na resposta fenológica vegetal podendo alterar a periodicidade e intensidade das fenofases (KUPLICH *et al.*, 2013); isto porque, esta compreensão do clima sobre o desenvolvimento vegetal fornece bases para a compreensão desses fatores no metabolismo da planta, desencadeado e/ou inibindo algumas rotas metabólicas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Entretanto, apesar do seu uso amplo, não foram encontrados dados a respeito de sua fenologia em resposta ao ambiente em que está inserida, sendo necessário o emprego de ferramentas que forneçam essas informações, possibilitando o cultivo da espécie em larga escala.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo acompanhar e descrever a fenologia de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, com o intuito de obter informações importantes para a domesticação da espécie e também analisar a influência dos fatores climáticos nas fenofases, além de determinar a ocorrência de sincronia nesses eventos fenológicos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O experimento foi realizado na área experimental do Departamento de Horticultura da Fazenda Experimental Lageado na Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista, em Botucatu-SP situada a 22°50'38.4" de Latitude Sul, 48°26'01.3" de Longitude Ocidental com altitude de 830 metros. Na classificação de Koppen (1948), o clima da região é o Cfa (clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C).

Foram utilizados 52 indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. As mudas foram produzidas a partir de sementes de plantas matrizes do Horto Medicinal do Grupo Centroflora sediado em Botucatu-SP, sendo o transplântio

realizado no mês de agosto/2018, cerca de cinco meses após a produção, quando as mudas atingiram tamanho ideal de 10 cm.

O espaçamento utilizado foi de 0,5x0,5 m entre plantas e 1,0 m entre fileiras. Durante o período de cultivo não foram realizados preparo de solo e tratos culturais, também não foi empregada a irrigação, somente capina manual quando necessário. Os atributos químicos do solo de cultivo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Análise dos atributos químicos (macro e micronutrientes) do solo proveniente do ambiente de cultivo

pH	M.O.	Presina	Al ³⁺	H+Al	Na	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmolc/dm ³						mg/dm ³								
4,4	21	5	3	36	-	1,4	10	3	14	51	29	10	0,21	2,3	74	6,3	0,8

Fonte: Departamento de solos e recursos ambientais da FCA/Unesp

Fenologia

As observações e coleta de dados fenológicos foram realizadas mensalmente no período de setembro de 2018 a agosto de 2019 totalizando 12 observações ao final do período de estudo.

A intensidade das seguintes fenofases foram registradas: (1) Brotamento: tendo início a partir do aparecimento de brotos foliares até a expansão total das folhas novas; (2) Folhas maduras: folhas completamente expandidas, com coloração verde escura; (3) Senescência foliar: notada pelo amarelecimento progressivo das folhas; (4) Floração: aparecimento dos botões florais até antese das últimas flores; (5) Frutificação: notada pelo fim da antese e posterior confirmação da existência de sementes.

A fim de quantificar as fenofases empregou-se a escala intervalar semi-quantitativa de cinco categorias e intervalo de 25% entre cada categoria, ausência da fenofase; presença da fenofase com magnitude entre 1 e 25%; presença da fenofase entre 26 e 50%; presença da fenofase entre 51 e 75% e presença da fenofase entre 76 e 100% sendo a metodologia proposta por Fournier (1974) e adaptada para o presente estudo.

Avaliou-se concomitantemente, a sincronia da população seguindo a proporção de indivíduos que manifestaram determinado evento fenológico: < 20% assincrônico; 20-60% pouco sincrônico; > 60% sincrônico (BENCKE; MORELLATO, 2002).

Dados Climáticos

Os dados meteorológicos foram obtidos na Estação Meteorológica do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, localizada próxima da área de estudo. Foram empregados os dados precipitação, temperatura e umidade. Foi avaliada pela correlação de Pearson (r) a relação entre as variáveis climáticas e a intensidade das fenofases.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Bencke e Morellato (2002), gervão-roxo pode ser considerada uma espécie altamente sincrônica, pois mais de 60% dos indivíduos avaliados manifestaram ao mesmo tempo a fenofase avaliada. As porcentagens para espécie em estudo correspondem 90 a 100% de sincronia para os eventos fenológicos, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 2 - Grau de sincronia por fenofases, em porcentagem de indivíduos de *S. cayennensis*, estimado no período de máxima atividade das espécies, Botucatu- SP, 2018/2019

	Brotamento	Folhas maduras	Senescência	Floração	Frutificação
Grau (%)	100	90	90	100	100

Fonte: da autora

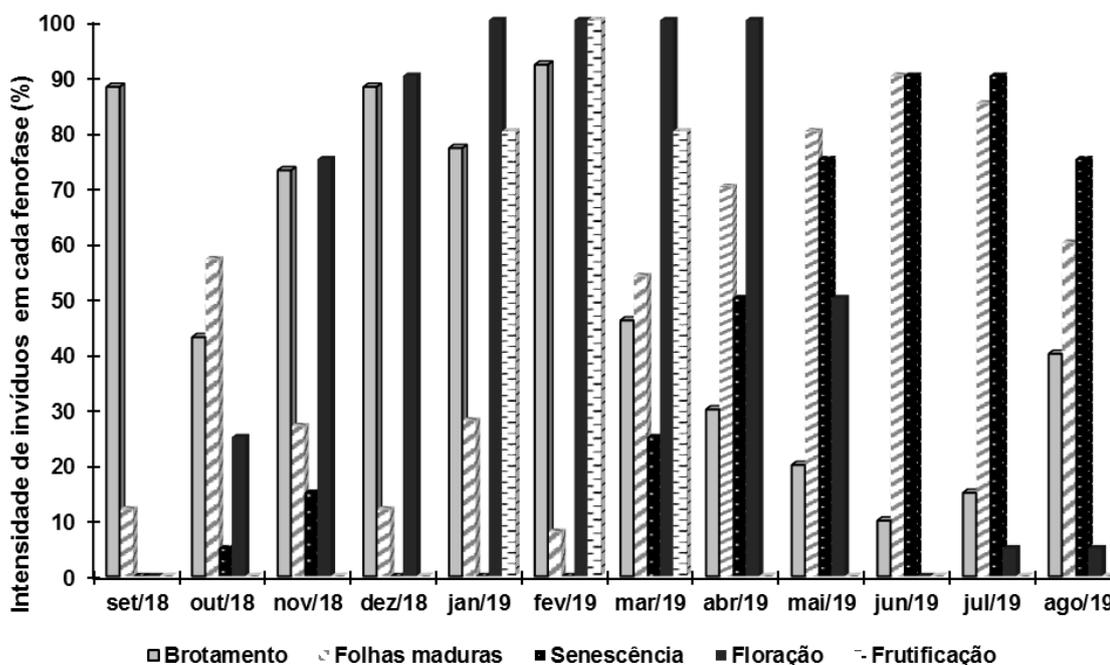
Caldeira Júnior *et al.* (2008) ressaltam que o alto grau de sincronia de uma fenofase, expressa por uma população, promove uma facilidade no manejo adotado no campo, uma vez que a maioria dos indivíduos apresentará em um certo período a mesma fenofase. Devido a isso, é possível fazer inferências sobre melhor época de

plântio, colheita (levando em consideração a parte da planta de interesse), de propagação da espécie, dentre outras.

Após o transplântio, foi observado aumento gradual da porcentagem de folhas novas que se manteve elevado até o mês de março, onde ocorre uma diminuição da intensidade de brotamento que tem recomeço em agosto. O período com maior intensidade de folhas maduras foi de março a agosto com pico de intensidade no mês de junho. A senescência das folhas foi observada de forma expressiva somente a partir de março, com picos nos meses de junho e julho/2019 chegando a 90%. Para a floração da espécie, teve início no mês posterior ao transplântio (outubro/2018) e se manteve durante todo o período de avaliação, sendo que o único mês em que não foi observado foi junho, período este de alta taxa de senescência foliar. O período de frutificação foi de janeiro a março com pico máximo de indivíduos em floração no mês de fevereiro.

A resposta fenológica da espécie estudada nos meses avaliados se encontra na figura 1.

Figura 1- Intensidade de fenofase em indivíduos de *S. cayennensis* no período de avaliação



Segundo Morellato *et al.* (1989) as espécies que apresentam um período de maior intensidade de queda foliar, expressando diferentes padrões de emissão de

folhas novas concentrado em um período do ano, contudo não ficando totalmente sem folhas, são classificadas como semidecíduas, quanto ao padrão de brotamento e queda foliar. No presente estudo *S. cayennensis* manifestou estes padrões, enquadrando-se nesta classificação.

Janzen (1975) ressalta, que o sincronismo das fenofases floração e frutificação, traz vantagens para a espécie, pela atração de polinizadores e dispersão de sementes. Destaca ainda, que a existência deste sincronismo, está relacionada com o ajuste do padrão evolutivo da espécie, para manifestação em alta intensidade desta fenofase com disponibilidade de agentes dispersores, e posteriores condições que propiciem a germinação. Além disso, a frutificação concentrada facilita o manejo para campos de produção de sementes para comercialização.

A resposta fenológica da espécie está correlacionada com fatores climáticos como temperatura média (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm) em que foi possível observar que as variações destes fatores promoveram respostas em cada fenofase como demonstrado da Tabela 2.

Tabela 3 - Correlações de Pearson (r) entre as fenofases avaliadas de *S. cayennensis* e os fatores climáticos (temperatura, umidade médias e pluviosidade), na Fazenda Lageado- FCA/UNESP, Botucatu. 2018-2019.

	Brotamento	Folhas maduras	Senescência	Floração	Frutificação
Temperatura média(°C)	0,43	0,55	-0,49	0,83	0,59
Umidade relativa média (%)	0,12	0,19	-0,05	0,54	0,38
Precipitação(mm)	0,43	0,52	-0,41	0,61	0,57

Fonte: da autora

Para o brotamento, folhas maduras e frutificação foram observadas correlações positivas moderadas com temperatura e precipitação (figuras 2 e 3) e fracas para umidade relativa.

Figura 2- Intensidade da fenofase em relação à temperatura (°C) de indivíduos de *S. cayennensis*.

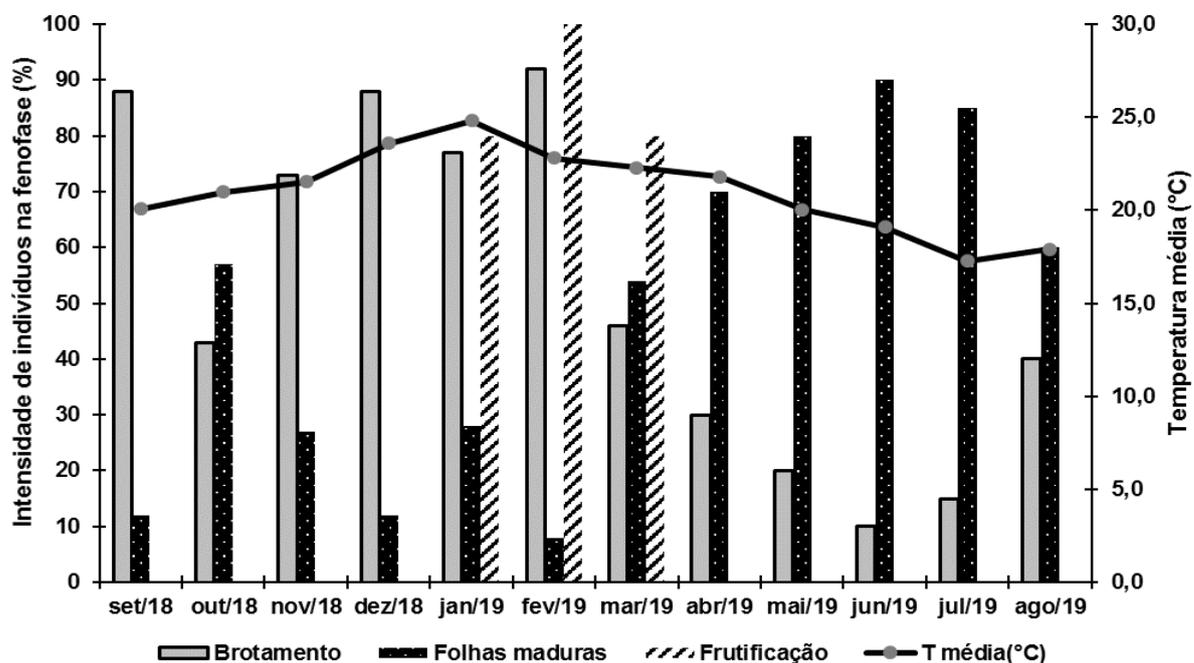
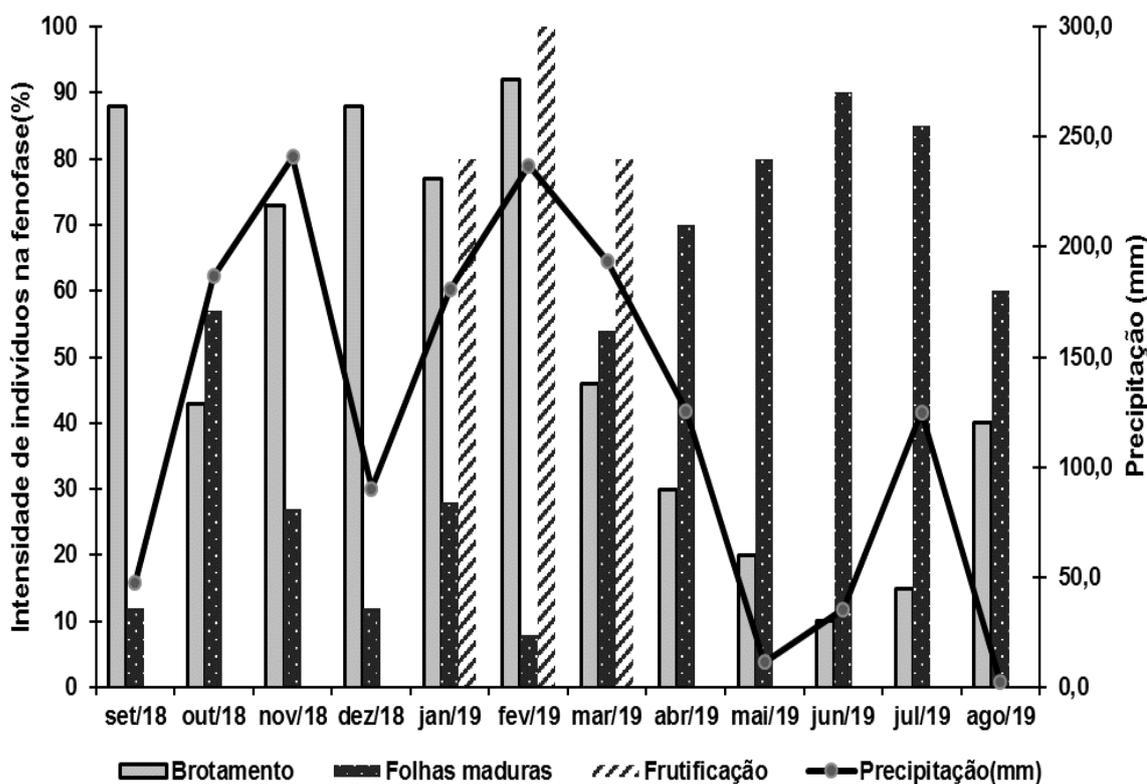


Figura 3- Intensidade da fenofase em relação à precipitação (mm) de indivíduos de *S. cayennensis*



As atividades hormonais nas plantas, pode estar associada ao surgimento ou a perda de órgãos, como as folhas. O organismo vegetal, poderá sofrer influência de fatores como a temperatura e precipitação, em que pequenas oscilações do estímulo ambiental, promovem o aumento ou redução de hormônios presentes no tecido vegetal, causando uma resposta final (TAIZ; ZEIGER, 2017).

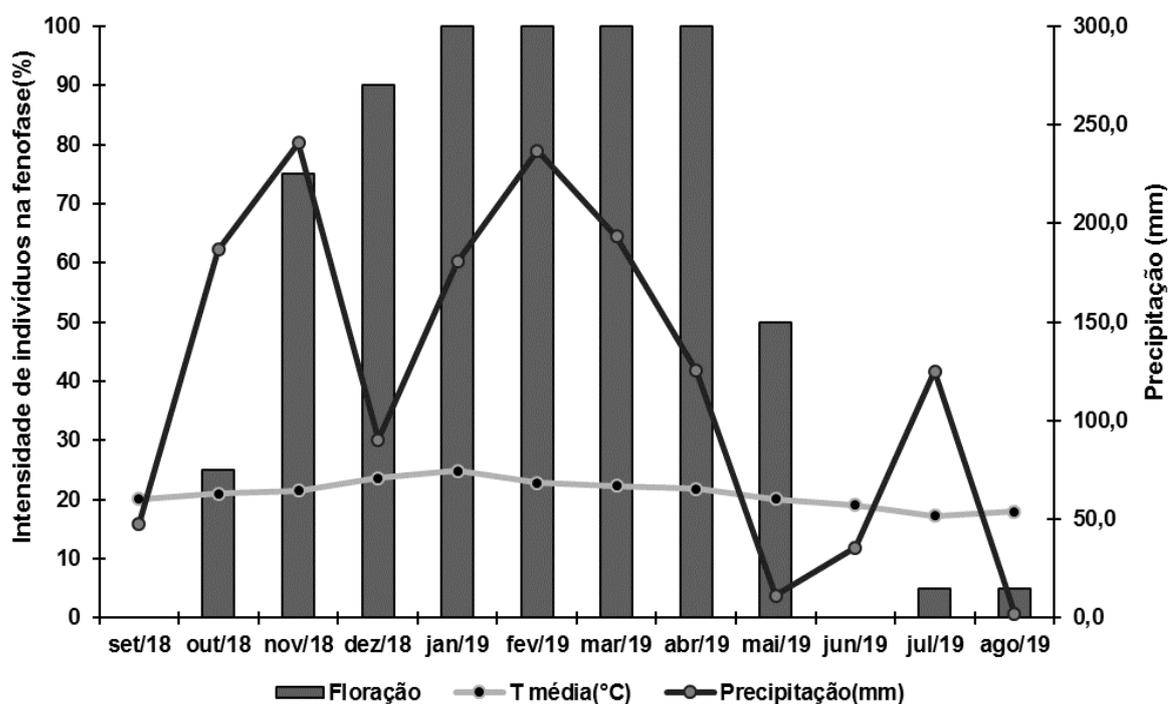
A temperatura, pode provocar alterações na taxa de crescimento das plantas, onde foi possível observar que incrementos na temperatura média do ambiente de estudo ocasionaram aumento na intensidade de indivíduos na fenofase brotamento bem como início da frutificação. Além disso, a redução da temperatura média ocasionou no aumento da taxa de senescência, pois em meses de menor temperatura (inverno), pode ocasionar em redução da condutância estomática, na taxa transpiratória e queda na demanda por fotoassimilados, mecanismos que antecedem o repouso vegetativo (MACHADO *et al.*, 2002; SANTOS, 2010).

A precipitação pode ser considerada como o fator abiótico de maior influência na dinâmica de *S. cayennensis* para as fenofases brotação, já que o aumento do volume hídrico aumentou a intensidade de indivíduos na fenofase, tal resposta indica que pequenas quantidades de água disponíveis para absorção, são suficientes para quebra de dormência das gemas e indução do brotamento (BORCHERT *et al.*, 2002). Para a frutificação, após alta precipitação houve início da fenofase, e outra elevada precipitação no mês de maior produção de frutos, favorecendo a germinação e o estabelecimento de plântulas em ambiente natural (RANIERI *et al.*, 2012). Para Pedroni *et al.* (2002), os picos dessas fenofases durante a alta precipitação está relacionada com a maximização do ganho de carbono durante tal condição ambiental, como estratégia de adaptação a disponibilidade de recursos. A presença de água disponível para absorção no ambiente, permite com que os estômatos permaneçam abertos e, que as reações fotossintéticas e outros processos metabólicos aconteçam, promovendo assim um incremento no acúmulo de carbono. Em contrapartida, sob déficit hídrico, como resposta ao estresse a fotossíntese pode ser reduzida e o crescimento inibido (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Já para a floração, foi possível observar correlação positiva muito forte para temperatura média, em que a elevação da temperatura promoveu aumento da intensidade de floração. E ainda, apresentou correlação forte e positiva para precipitação, determinando o pico de floração com os meses em que houve sequência de volume de chuva. Seguido pela queda da floração, com o início do

período seco (figura 4). Todas as fenofases apresentaram correlação fraca para umidade relativa do ar, exceto a fenofase floração.

Figura 4- Intensidade de floração em relação a temperatura (°C) e precipitação (mm) e umidade relativa (%) em indivíduos de *S. cayennensis*.

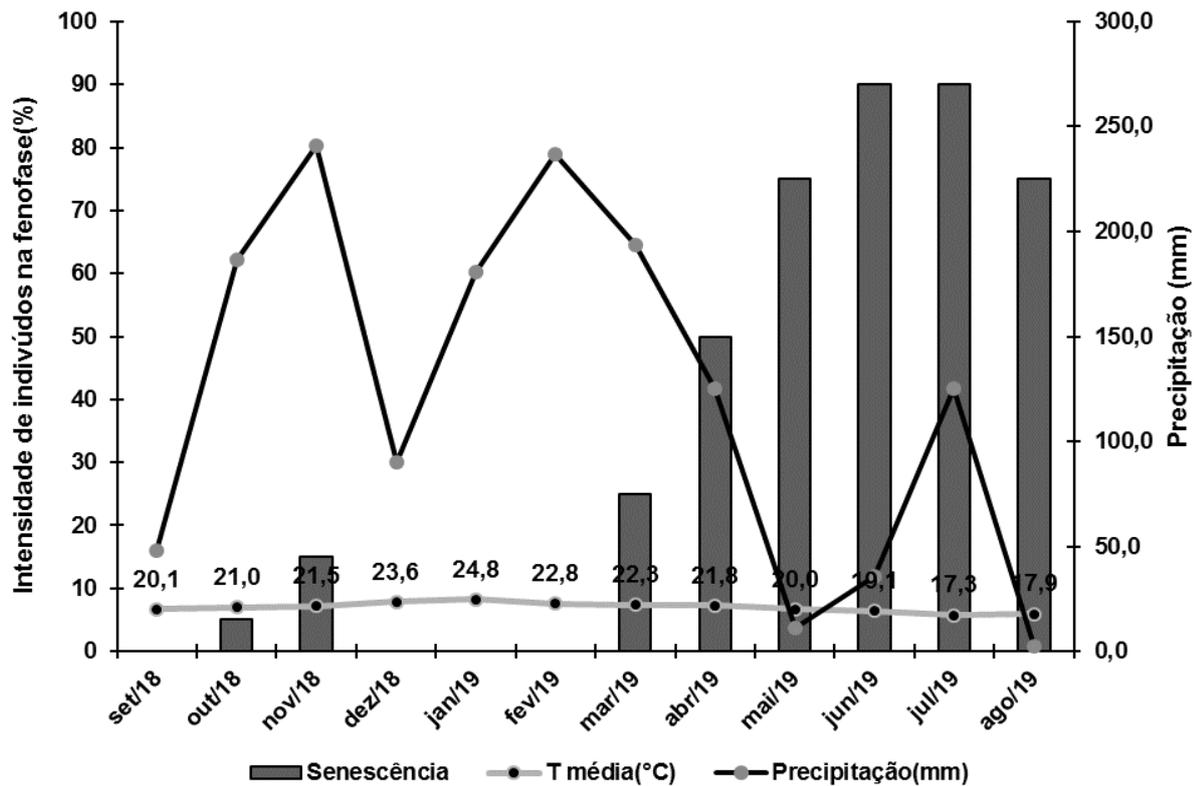


Durante o período de estudo, foi observada a presença de flores em todas as plantas, variando a intensidade no decorrer dos meses, com ausência somente em junho, que de acordo Whitmore (1990), tal persistência da floração corresponde ao comportamento de espécies pioneiras. Esta estratégia, pode ser definida como contínua, com picos de floração em certos períodos, já que pelo menos um indivíduo apresenta a fenofase de forma constante, podendo mostrar-se ausente por até dois meses (MORELLATO, 1991; NEWSTROM *et al.*, 1994).

Viana e Kleinert (2005) ressaltam que a presença de flores de forma prolongada, promove a renovação dos grãos de pólen, em resposta às flutuações nas populações de polinizadores potenciais, mantendo a presença de agentes de polinização ao longo do tempo, contudo esta característica, geralmente não infere, que haja uma transformação efetiva, de flores em frutos viáveis (SANTOS *et al.*, 1997).

Para senescência foi observada correlação negativa moderada para temperatura e precipitação (figura 5), em que a redução da precipitação e diminuição da temperatura média promoveram aumento da taxa de senescência, o início do período frio e seco promoveu a queda intensa das folhas.

Figura 5- Intensidade de senescência em relação a temperatura (°C) e precipitação (mm) em Indivíduos de *S. cayennensis*



A redução da temperatura média e da precipitação, são características do início da estação seca, como ocorreu no ambiente de estudo. Durante este período, há uma redução na quantidade de água no solo e no ar, o que dificulta a absorção de nutrientes, resultando na abscisão foliar, como estratégia de economia hídrica (BORCHERT *et al.*, 2002). A baixa disponibilidade de água, promove aumento da concentração de ácido abscísico (ABA) nas células estomáticas, ocasionando o fechamento do complexo pela saída de água do interior da célula. A presença deste hormônio em alta concentração dá início do processo de senescência, que poderá culminar na abscisão das folhas. Assim, ocorre a redução da superfície de perda de água pela planta como resposta ao estresse (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Vale ressaltar ainda, que *S. cayennensis* apresentou comportamento semidecíduas durante o período de avaliação, para as condições de Botucatu/SP,

com alta taxa de senescência no período de abril a agosto, meses que apresentaram baixas temperaturas e precipitação. Segundo Caldeira Júnior *et al.* (2011), o conhecimento sobre esta característica em ambiente de cultivo, possibilita a adoção da irrigação, como alternativa para um possível aumento na produção foliar, já que as folhas são as utilizadas com finalidade medicinal.

1.4 CONCLUSÃO

A espécie é sincrônica entre as fenofases. Há correlação entre os fatores ambientais e as fenofases avaliadas. A fenofase floração apresentou-se de forma contínua para a área de estudo e possui alta correlação com a temperatura. Períodos ambientais de baixas temperaturas promove senescência foliar intensa. A precipitação tem influência direta com o início das fenofases avaliadas.

REFERÊNCIAS

ADEBAJO, A.C.; OLAWODE E.O.; OMOBUWAJO O.R.; ADESANYA S.A.; BEGROW F.; ELKHAWAD A.; AKANMU M.A.; EDRADA R.; PROKSCH P.; SCHMIDT T.J.; KLAES M.; VERSPOHL E.J. Hypoglycaemic constituents os *Stachytarpheta cayennensis* leaf. **Planta med.** v. 73, n. 03, p. 241-250, 2007.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Ed. Hemus, 1993, 341 p.

ANDREIS, C.; LONGHI, S.J.; BRUN, E.J; WOJCIECHOWSKI, J.C.; MACHADO, A.A.; VACCARO, S.; CASSAL, C.Z. Estudo fenológico em três fases sucessionais de uma floresta estacional decidual no município de Santa Tereza, RS, Brasil. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.1, p.55-63, 2005.

ATKINS, S. O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) no Brasil. *Kew Bulletin*, v. 60, n. 2, p. 161, 2005.

BENCKE, C.C.; MORELLATO, L.P.C. Comparação de dois métodos de avaliação de fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p. 269-75, 2002.

- BLANCO, L., VIGNOLI, T., REIS, G. M., MALVAR, D. D. C., PIRES, P. D. A., DE SOUZA, P. A., & CÔRTEZ, W.D.S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista Universidade Rural, Série Ciência e vida**, v. 25, n.1, p.78-84, 2005.
- BORCHERT, R.; RIVERA, G.; HAGNAUER, W. Modification of vegetative phenology in a tropical semideciduous forest by abnormal drought and rain. **Biotropica**, v.34, p.381-93, 2002.
- CALDEIRA JÚNIOR, C. F.; SANTOS, A.M.; QUEIROZ, J.M.R.; DE PAULA, T.O.M.; MARTINS, E.R. Fenologia da fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, 2008.
- CASTRO, E. R.; GALETTI, M.; MORELLATO, L. P. C. Reproductive phenology of *Euterpe edulis* (Arecaceae) along a gradient in the Atlantic rainforest of Brazil. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 7, p. 725-735, 2007.
- D'EÇA NEVES, F.F.; MORELLATO, P.C. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.1, p.99-108,2004.
- DIAS, H.C.T. **Fenologia de quatro espécies arbóreas e variação temporal e espacial da produção de serrapilheira em uma área de floresta estacional semidecidual montana em Lavras-MG**. 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FERREIRA, E. Q. **Pharmaceutical composition on the basis of stachytarpheta sp., a process for obtaining the same and its use for treating vitiligo**. U.S. Patent Application n. 12/527,242, 4 fev. 2010.
- FOURNIER, L.A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v.24, n.4, p.422-3, 1974.
- JANZEN, D.H. Ecology of plants in the tropics. London: Edward Arnold, 1975. 66p.
- KUPLICH, T. M.; MOREIRA, A.; FONTANA, D. C. Série temporal de índice de vegetação sobre diferentes tipologias vegetais no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1116-1123, 2013.

LONGHI, S. J. Fenologia de algumas espécies florestais e ornamentais. *Ciência Rural*, v.14. n.3-4, p.231-240, 1984.

LORENZI, H. **Manual de identificação de identificação e controle de plantas daninhas**: plantio direto e convencional. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 4, n. 1, 339p. 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; GOMES, M.M.A.; HABERMANN, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranjeira 'Valência'. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, p. 53-58, 2002.

MAQUIAVELI, C.D.; OLIVEIRA, E.Sá.A.M.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, E.R. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonenses* via parasite arginase inhibition. **Journal Ethnopharmacol.** v. 192, p. 108-113, 2016.

MORELLATO, L. P. C.; RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. D.; JOLY, C. A. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 12, n. 1, p. 85-98, 1989.

OKOKON J.E.; ETTEBONG E.; ANTIA B.S. *In vivo* Antimalarial Activity of Ethanolic Leaf Extract of *Stachytarpheta cayennensis*. **Indian Journal of Pharmacology.** v. 40, n. 3, p. 111, 2008.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F.A.M. Fenologia de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf. Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.183-94, 2002.

PENIDO C.; COSTA K.A.; FUTURO D.O.; PAIVA S.R.; KAPLAN W.A.; FIGUEIREDO M.R.; HENRIQUES M.G. Anti-inflammatory and Anti-ulcerogenic Properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 104, n. 1-2, p. 225-233, 2006.

PIO CORREA, M.; **Dicionário das plantas úteis ao Brasil**. Ministerio de Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Vol III, pag. 395, 1984.

RANIERI, B. D.; NEGREIROS, D.; LANA, T. C.; PEZZINI, F. F.; FERNANDES, G. W. Fenologia reprodutiva, sazonalidade e germinação de *Kielmeyera regalis* Saddi (Clusiaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 632-641, 2012.

SANTOS, C. M. A. **Respostas da fotossíntese à variação da temperatura do ar e das raízes em mudas de laranjeiras 'Valência'**. 2010. 51 p. Dissertação (Mestrado em Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola) – Instituto Agronômico, Campinas.

SANTOS, R. C.; MORAES, J. S.; GUIMARÃES, M.B. Caracteres de floração e reprodução em genótipos de amendoim do tipo ereto, ramador e decumbente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1257-1262, 1997.

SCHAPOVAL, E.E.S.; DE VARGAS, M.R.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES A.T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, n. 1, p. 53-59, 1998.

TAIZ, L; ZEIGER, E., MULLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 6 ed., 2017.

VIANA, B. F.; KLEINERT, A. M. P. A community of flower-visiting bees (Hymenoptera: Apoidea) in the coastal Sand dunes of Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 79-91, 2005.

WHITMORE, T. C. An introduction to tropical rain forests. Seasonal rhythms. **Clarendon Press**, Oxford, 52-57 p. 1990.

CAPÍTULO 2

ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DAS FOLHAS E FLORES DE *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)

RESUMO

Stachytarpheta cayennensis, conhecida popularmente como gervão-roxo, tem sido utilizada na medicina popular e na indústria devido a produção de compostos secundários de interesse. A caracterização anatômica e histoquímica pode revelar informações essenciais afim de se fomentar o uso, manejo e cultivo desta espécie. O presente estudo tem por objetivo descrever a anatomia e histoquímica de folhas e flores de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl em resposta ao ambiente de cultivo. Para as análises anatômicas e histoquímicas foram coletadas folhas totalmente expandidas e flores, de dez indivíduos (n = 10) que apresentavam os mesmos estádios fenológicos, tomados de forma aleatória na área de estudo. O material coletado foi fixado em formalina neutra tamponada – FNT. Amostras de folhas e flores foram processadas de acordo com técnica convencional para historesina, seccionadas em micrótomo rotativo, e as lâminas coradas com Azul de Toluidina. Além disso, amostras foram seccionadas a mão livre foram coradas com Azul de Astra e Safranina, e submetidas a diferentes testes histoquímicos. Foi realizada a determinação de compostos fenólicos totais método de Folin-Ciocalteu. As folhas possuem epiderme unisseriada, com estômatos em ambas as faces; foram identificados quatro tipos de tricomas, sendo dois do tipo glandular e dois tectores. O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído de apenas uma camada de células e o parênquima lacunoso com geralmente quatro camadas de células. A nervura central é proeminente com feixe vascular colateral fechado. As flores apresentaram corola tubulosa, pentâmera, gamopétalas, com epiderme papilosa e paredes lignificadas com presença de tricomas tectores e glandulares. Os compostos fenólicos foi a classe encontrada em maior abundância no mesofilo foliar. Além disso, nas flores grande quantidade de compostos fenólicos foi evidenciada pela coloração. O teor médio de compostos fenólicos encontrado nas folhas foi 2037,49 mg de ácido gálico por 100g de massa seca. A descrição de folhas e flores

estão em consonância com a literatura, onde não houve influência do cultivo. O teor de compostos fenólicos quantificados foi superior aos valores descritos na literatura.

Palavras-chaves: Compostos fenólicos. Plantas medicinais. Tricomas.

ABSTRACT

Stachytarpheta cayennensis, popularly known as purple gervão, has been used in folk medicine and industry due to the production of secondary compounds of interest. Anatomical and histochemical characterization can reveal essential information in order to promote the use, management and cultivation of this species. The present study aims to describe the anatomy and histochemistry of leaves and flowers of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl in response to the growing environment. For anatomical and histochemical analysis, fully expanded leaves and flowers were collected from ten individuals (n = 10) who had the same phenological stages, taken at random in the study area. The collected material was fixed in neutral buffered formalin - TNF. Samples of leaves and flowers were processed according to the conventional technique for historesin, sectioned in a rotating microtome, and the slides stained with Toluidine Blue. In addition, samples were sectioned freehand, stained with Astra Blue and Safranin, and subjected to different histochemical tests. The determination of total phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu method was performed. The leaves have uniseriate epidermis, with stomata on both sides; four types of trichomes have been identified, two of which are glandular and two are protectors. The mesophyll is dorsiventral, with a palisade parenchyma consisting of only one layer of cells and the lacunous parenchyma with generally four layers of cells. The central rib is prominent with a closed collateral vascular bundle. The flowers presented tubular corolla, pentamer, gamopetals, with papillary epidermis and lignified walls with the presence of tector and glandular trichomes. Phenolic compounds were the class found in greater abundance in the leaf mesophyll. In addition, in flowers a large amount of phenolic compounds was evidenced by color. The average content of phenolic compounds found in the leaves was 2037.49 mg of gallic acid per 100g of dry mass. The description of leaves and flowers are in line with the literature, where there was no influence of cultivation. The content of quantified phenolic compounds was higher than the values described in the literature.

Keywords: Phenolic compounds. Medicinal plants. Trichomes.

2.1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são definidas como aquelas em que, toda ou parte, provinda de ambiente de cultivo ou não, têm-se a presença de substâncias que podem ser empregadas com finalidade terapêutica ou como precursores de outros fármacos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O emprego de plantas com finalidade terapêutica, acompanha a humanidade desde seu surgimento, para fins de tratamento e cura de doenças.

A família Verbenacea compreende cerca de 34 gêneros (STEVENS, 2010), dentre eles está compreendido o gênero *Stachytarpheta*, que apresenta algumas espécies utilizadas para fins medicinais das quais pode-se destacar *S. cayennensis*. Estudos anatômicos de *S. jamaicensis* mostrou epiderme espessa com células uniformes, com parênquima paliçádico com cerca de 3 camadas de células (OKEKE *et al.*, 2015). *S. jamaicensis* e *S. cayennensis* (IDU *et al.*, 2009) que descrevem a epiderme com células mais delgadas em gervão-roxo, com presença de tricomas na superfície foliar e presença de estômatos em ambas as faces da folha, todavia em maior distribuição na face abaxial.

A espécie possui diversas ações medicinais já testadas como a atividade leshimanicida (MAQUIAVELI *et al.*, 2016), anti-inflamatória (SHAPOVAL *et al.*, 1998; PENIDO *et al.*, 2006), entre outras. Além disso, vem sendo estudada pelo interesse da indústria frente ao seu potencial de utilização como componente de um fitomedicamento para o tratamento da doença do vitiligo, por ter apresentado em testes clínicos baixa toxicidade (FERREIRA, 2010). Apesar de sua ampla utilização para fins medicinais, estudos que forneçam dados a respeito da anatomia e histoquímica da espécie não foram encontrados.

A anatomia vegetal, é responsável pela descrição e classificação da estrutura interna dos órgãos vegetais e suas funções, possibilitando inferir tendências adaptativas e compreender o funcionamento do vegetal em diversos ambientes. (FAHN; CUTLER, 1992; DICKISON, 2000). Concomitante aos estudos anatômicos, a histoquímica vem sendo aplicada por permitir a identificação de substâncias, em seu local de produção ou de armazenamento, no vegetal por meio de aplicação de reagentes e soluções (DÔRES, 2007). Deste modo, a aplicação desta técnica permite além de identificar as classes químicas presentes na planta, os locais onde a mesma é produzida e armazenada, e através da coloração em que órgão e/ou estrutura se tem maior disponibilidade, permitindo que as técnicas de manejo sejam

adotadas com maior eficiência para incremento na produção do metabólito de interesse (DÔRES, 2007; GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Zanetti *et al.* (2004) destacam que cada vez mais a indústria farmacêutica tem requerido a utilização de estudos de anatomia vegetal para caracterização das plantas medicinais destinadas a produção de fitoterápicos, uma vez que estes possibilitam uma padronização da droga vegetal utilizada no processo como matéria-prima, pela obtenção de modelos macro e microscópicos provindos de estudos morfológicos das plantas utilizadas. Vale ressaltar ainda que estes modelos de estudos são aplicados devido a fatores como baixo custo de realização, tempo reduzido quando comparada a outras técnicas e ainda fornece parâmetros básicos para diferenciar espécies medicinais similares que não apresentam o composto de interesse (DI STASI, 1996; MARQUES, 1999).

As plantas medicinais sofrem influência direta do manejo adotado no sistema de cultivo, podendo afetar diretamente a qualidade e quantidade de princípios ativos produzidos, em respostas principalmente a fatores ambientais, estes por sua vez podem influenciar diretamente a anatomia foliar (GOBBO NETO; LOPES, 2007; CASTRO *et al.*, 2009). Por essa razão, os estudos anatômicos se mostram cada vez mais relevantes para a produção vegetal, pois fornece respostas das dinâmicas dos organismos frente a diferentes categorias de manejo (SILVA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo descrever a anatomia foliar e das flores de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, bem como identificar os principais locais de síntese e armazenamento de compostos químicos produzidos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi realizado na área experimental do Departamento de Horticultura da Fazenda Experimental Lageado, na Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista, em Botucatu-SP, situada a 22°50'38,4" de Latitude Sul, 48°26'01,3" de Longitude Ocidental, com altitude de 830 metros. Na classificação de Koppen (1948), o clima da região é o Cfa (clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C).

Foram utilizados 52 indivíduos de *S. cayennensis*, através de mudas previamente produzidas com idade de aproximadamente cinco meses. As mudas foram produzidas a partir de sementes de plantas matrizes do Horto Medicinal do Grupo Centroflora sediado em Botucatu-SP, sendo o transplântio realizado no mês de agosto/2018, quando as mudas atingiram tamanho ideal para campo. O espaçamento utilizado foi de 0,5x0,5 m entre plantas e 1,0 m entre fileiras.

O local de cultivo apresentou até o momento da coleta temperatura média de 22°C, umidade relativa do ar média de 70,1% e precipitação total de 1313,1 mm. O solo, apresentou os seguintes atributos químicos e físicos: pH em 4,4; M.O. 21 g/dm³; P em resina 5 mg/dm³; 3 mmolc/dm³; H+Al 36 mmolc/dm³; Na 0 mmolc/dm³; K 1,4 mmolc/dm³; Ca 10 mmolc/dm³; Mg 3 mmolc/dm³; SB 15; CTC 51; V 29%; S 10 mg/dm³; B 0,21 mg/dm³; Cu 2,3 mg/dm³; Fe 74 mg/dm³; Mn 6,3 mg/dm³; Zn 0,8 mg/dm³. Durante o período de cultivo não foram realizados preparo de solo e tratamentos culturais, somente capina manual quando necessário.

As análises anatômicas e histoquímicas foram realizadas em folhas totalmente expandidas e flores de dez indivíduos (n = 10) que apresentavam os mesmos estádios fenológicos, tomados de forma aleatória na área de estudo. A coleta do material vegetal para análises anatômicas e histoquímica foi realizada em maio de 2019, período que antecede a senescência foliar intensa da espécie. As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar e fixadas em solução de FNT (formalina neutra tamponada) (CLARK, 1973).

As amostras foram levadas ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada na cidade de Seropédica-RJ, onde foram processadas e analisadas.

Caracterização morfométrica e anatômica

A caracterização morfométrica das flores foram baseadas nas terminologias propostas por Vidal e Vidal (2006). Para as análises anatômicas foram utilizadas a porção mediana do limbo foliar e flores completas (presença de cálice, corola, androceu e gineceu). As amostras foram desidratadas em série etílica até 100%, e embebidas em resina metacrilato (GERRITS, 1991). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo semiautomático a 3 µm de espessura e as seções foram coradas em azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'BRIEN *et al.*, 1964). Além disso,

amostras de material fixado foram seccionadas com auxílio de micrótomo de Ranvier e as secções com cerca de 10 µm de espessura foram coradas Azul de Astra e Safranina (ROESER, 1972); lâminas semi-permanentes foram montadas em gelatina glicerinada. A documentação e avaliação dos resultados foram realizadas em fotomicroscópio Olympus modelo BX41TF com programa Image pro-insight.

Testes histoquímicos

Para identificação das principais classes químicas de substâncias presentes no limbo foliar, amostras foram seccionadas com auxílio de micrótomo de Ranvier e as secções com cerca de 10µm de espessura foram tratadas com: solução de Dicromato de Potássio para compostos fenólicos (GABE,1968), reagente de Nadi para terpenos (DAVID; CARDE, 1964), solução de Vermelho de rutênio para polissacarídeos (JOHANSEN, 1940), reagente Sudam III para lipídeos (PEARSE, 1972) e reagente de Dittmar e Dragendorff para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981). Os resultados foram analisados ao microscópio de luz, e os dados relevantes foram documentados por meio do fotomicroscópio Olympus modelo BX41TF com programa Image pro-insight.

Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Para quantificação dos compostos fenólicos totais, 27 amostras foram coletadas da população de 52 indivíduos, no mês de outubro/2019. Primeiramente foram preparados os extratos utilizando o correspondente a 200 mg do material vegetal seco e moído, o qual foi extraído em 10 mL de solução álcool etílico:água (80%). As amostras foram encaminhadas para banho ultrassônico por 15 minutos e posteriormente para centrifuga por 30 minutos.

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton *et al.* (1999) em que uma curva de calibração foi preparada utilizando uma solução padrão de ácido gálico na concentração de 10 a 100 mg/1000 mL. Para a quantificação de fenóis totais, foram pipetados 0,01 mL do extrato, 0,49 mL de álcool, 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (4% p/v), formando uma mistura de cor azul. Após 2 horas de escuro, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm. As quantificações foram feitas em

triplicata e o resultado expresso em mg de ácido gálico, por 100 gramas de matéria seca.

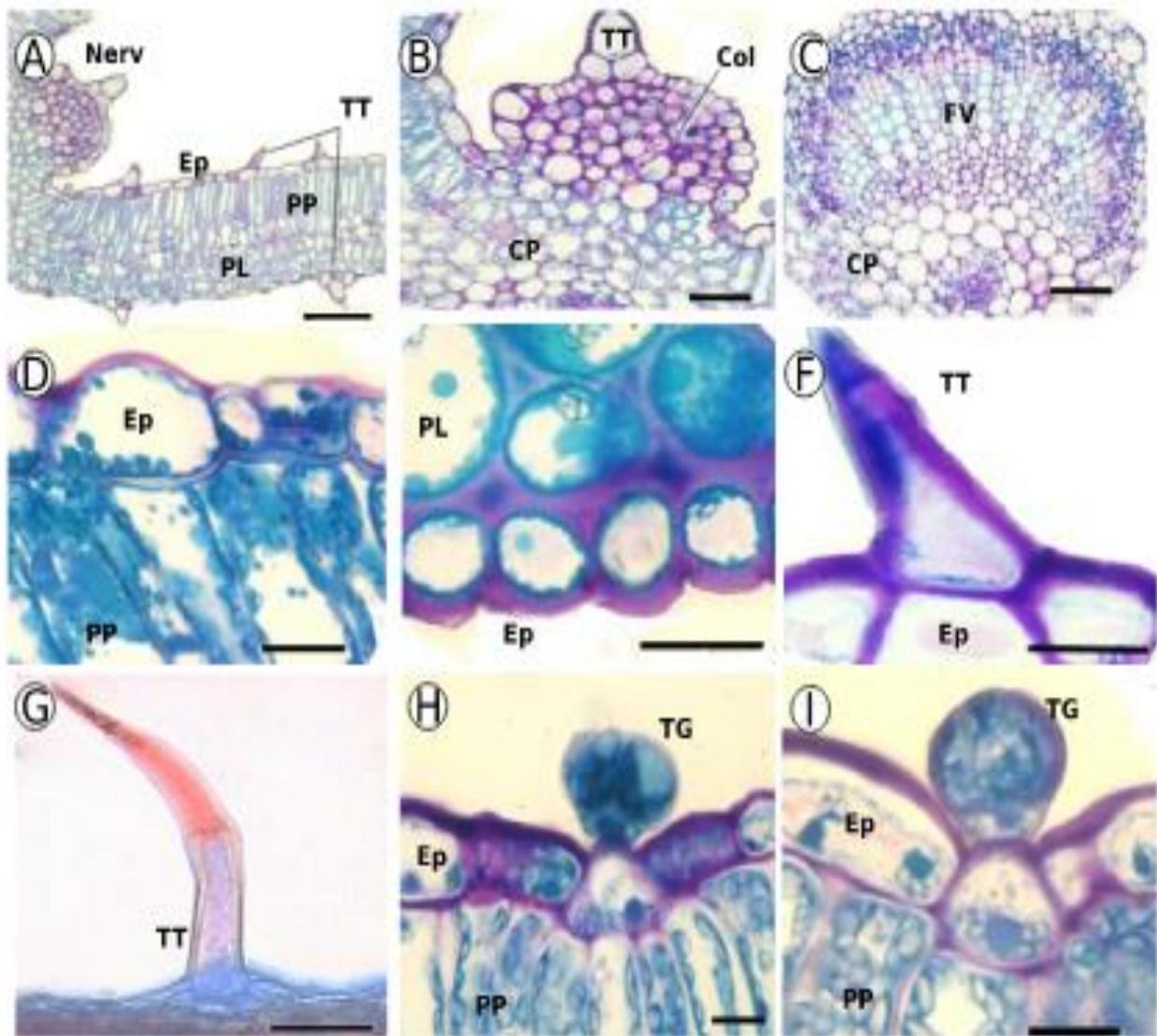
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização anatômica foliar

O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído de apenas uma camada de células e o parênquima lacunoso com geralmente 4 camadas de células (figura 6- A). A nervura principal é proeminente na face abaxial, formada por 6 camadas de colênquima abaixo da epiderme, córtex parenquimático formado por 3 camadas de células (figura 6-B e C) e feixe vascular colateral fechado.

A lâmina foliar em secção transversal apresentou epiderme uniestratificada, com cutícula delgada, e células da face adaxial (figura 6- D) com tamanho e volume maiores que a face abaxial (figura 6- E). Os estômatos geralmente ocorrem no mesmo nível das células epidérmicas, em ambas as faces da folha, sendo estas classificadas como anfiestomática. Quatro morfotipos de tricomas foram identificados: (I) tipo tector unicelular (figura 6-F), (II) tipo tricoma tector bicelular (figura 6-G), (III) tipo tricoma glandular, unisseriado, com base unicelular, pedúnculo unicelular curto e cabeça secretora unicelular ovalada (figura 6-H), (IV) tipo tricoma glandular, unisseriado, com base bi ou unicelular, pedúnculo longo, colar curto e cabeça secretora formada por quatro células (figura 6-I).

Figura 6- Secção transversal do limbo foliar de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.



A-Visão geral do mesofilo, mostrando tricomas tectores em ambas as faces da epiderme (150 μ m); B – Nervura foliar (60 μ m) C- Detalhe da nervura, mostrando o córtex e o feixe vascular (60 μ m); D- Detalhe da epiderme da face adaxial (15 μ m); E- Detalhe da epiderme da face abaxial (15 μ m); F- Tricoma tector unicelular (Tipo I) (15 μ m); G-Tricoma tector multicelular (Tipo II) (15 μ m); H-Tricoma glandular unicelular (Tipo III) (15 μ m); I-Tricoma glandular multicelular (Tipo IV) (15 μ m). Nerv= nervura, Ep=epiderme, PP=parênquima paliçádico, PL=parênquima lacunoso, TT=tricoma tector, TG=tricoma glandular, Col=colênquima, CP= córtex parenquimático, FV= feixe vascular.

Segundo Metcalfe e Chalk (1998), a espécie estudada apresenta as características típicas da família Verbenaceae com mesofilo dorsiventral e presença de tricomas glandulares e tectores. Paes (2011) em seu estudo com as folhas de *S.*

cayennensis evidenciou características de epiderme uniestratificada, organização do mesofilo, presença de diferentes tipos de tricomas glandulares e tectores que corroboram com este estudo, contudo as folhas apresentaram variações no número de camadas do colênquima de 3 a 4 camadas e cutícula mais espessa.

A presença de células epidérmicas modificadas como os tricomas, podem ocasionar alterações na dinâmica da herbivoria dos insetos, já que a presença dessas estruturas pode causar desde a redução e/ou paralização do consumo por parte do predador (AOYAMA; LABINAS, 2012). Estas estruturas podem afetar de forma mecânica, a mobilidade do inseto pela superfície foliar, a postura de ovos, influenciados pelo volume e formato dos tricomas do tipo tector. Ademais, a presença de substâncias químicas nestas estruturas, atuam como defesa química, podendo influenciar na palatabilidade do inseto, bem como ocasionando danos na estrutura bucal (CORRÊA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010). Além do emprego medicinal dado a espécies produtoras compostos secundários de interesse, o estudo da presença de tricomas (formato e densidade) e as substâncias produzidas e armazenadas nos mesmos, são de suma importância para que sejam identificadas plantas que possam atuar como barreiras vivas, promovendo ganhos ao ambiente, pelo uso adequado das substâncias e ao produtor, pela redução na aplicação de defensivos agrícolas (AOYAMA; LABINAS, 2012).

Almeida (2014) descreveu as características anatômicas de *Stachytarpheta jamaicensis* com epiderme uniestratificada, tricomas tectores, colênquima com cinco camadas de células, folhas anfiestomáticas, mesofilo composto por parênquima paliádico e lacunoso, em que algumas das características apresentadas corroboram com as descritas neste estudo.

Santos *et al.* (2004) em seu estudo com *Lippia alba* (Verbenaceae) as folhas apresentaram também as mesmas características da família com semelhança no número de camadas de células do mesofilo, bem como com tipos de tricomas iguais tector tipo I e glandular tipo IV. Sánchez *et al.* (2014) descreveu em seu estudo as características anatômicas de seis diferentes espécies representantes da família Verbenaceae em que as características encontradas para as espécies de presença de estômato em ambas as faces da folha, presença de tricomas glandulares e tectores de diferentes tipos, camadas de parênquima em menor número (2-3), com cutícula na maioria das espécies também espessas.

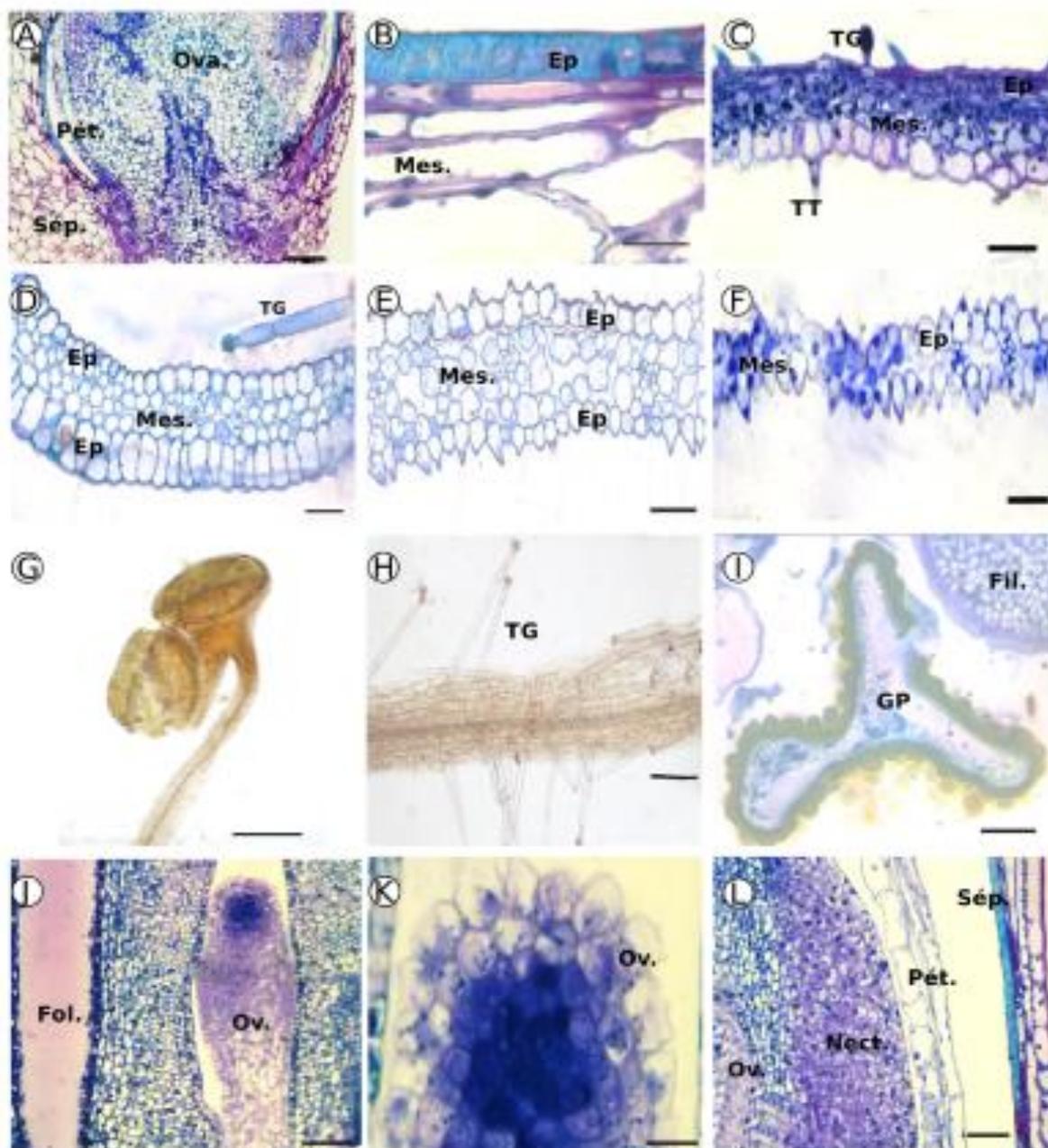
Rodella *et al.* (1993) ressalta que a presença do maior número de células no tecido parenquimático pode estar relacionada com uma maior eficiência no aparato fotossintético. Para Taiz e Zeiger (2017) esta eficiência pode ser atribuída ao maior número de cloroplastos presentes nas células parenquimáticas e ainda a capacidade de dissipação da luz pelas múltiplas camadas de tecido.

As divergências encontradas neste estudo para algumas características anatômicas podem ser explicadas pela condução da espécie em ambiente de cultivo. Uma vez que, as diversas práticas de manejo aplicadas nas plantas, podem influenciar diretamente no desenvolvimento do vegetal, em resposta as dinâmicas do ambiente em que está inserida. Tais variações ambientais, como precipitação, radiação e fotoperíodo, podem influir diretamente na anatomia dos órgãos vegetais, podendo ocasionar em flutuações no número de camadas do tecido parenquimático, no espessamento cuticular, número de complexos estomáticos, espaços intercelulares dentre outras alterações (SILVA *et al.*, 2005; VENTRELLA, 2000).

Caracterização morfométrica e anatômica das flores

As flores de *S. cayennensis* apresentaram corola tubulosa estreita, pentâmera (composta por 5 pétalas), gamopétalas, com coloração variando de lilás a roxo intenso; possui dois estames sendo estes classificados como epipétalos, estilete em inserção terminal; o ovário é composto por 2 carpelos e dois lóculos, mas com desenvolvimento de óvulo em apenas um.

Figura 7- Secção transversal e longitudinal da flor de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.



A- Visão geral da flor em secção longitudinal, mostrando todas as partes (60 μ m); B- Detalhe da epiderme lignificada da sépala (15 μ m); C- Visão geral da sépala, presença de tricomas (60 μ m); D- Visão geral da pétala na porção inicial, mediana e distal (60 μ m); G- Antera (400 μ m); H- Filete com presença de tricomas glandulares-Tipo IV (150 μ m); I-Secção transversal do grão de pólen (15 μ m); J- Secção longitudinal do ovário (60 μ m); K- Detalhe do ovário fértil (15 μ m); L- Secção longitudinal mostrando nectário floral (60 μ m). Sép= sépala, Pét=pétala, Ova= ovário, Ep= epiderme, Mês=mesofilo, TT= tricoma tector, TG=tricoma glandular, GP= grão de pólen, Fil= filete, Fol=folículo ovariano, Ov=óvulo, Nect=nectário.

A secção longitudinal das flores apresentou sépala com a epiderme da face adaxial com paredes espessas e lignificadas até 2721,71µm após a inserção no receptáculo (figura 7-B). A porção distal desta epiderme possui células pequenas, com formato arredondado, paredes finas, sem presença de lignificação. A face abaxial possui epiderme unisseriada com células quadradas com paredes pectocelulósicas. A presença de tricomas dos tipos I, II, III e IV foram observados por toda extensão da sépala nas faces adaxial e abaxial (figura 7-C). O mesofilo possui de 3-4 camadas de células alongadas. Foram observados ainda, pequenos pontos na sépala identificados como compostos fenólicos, com maior concentração na parte distal.

A pétala apresentou epiderme papilosa (figura 7-F) na face adaxial desde a base até a porção distal do tubo, na face abaxial as células da base são quadradas com epiderme delgada, tornando-se papilosa após a abertura da corola, com presença de tricomas tectores (tipos I e II) e glandulares (tipo III e IV) em todo comprimento do tubo. O mesofilo apresenta na base células alongadas, com epiderme delgada, com geralmente uma ou duas camadas com organização (figura 7-E), na porção distal o mesofilo apresenta células arredondadas com número de camadas compostas de uma a quatro células (figura 7-D).

Quanto aos verticilos férteis, o androceu é formado por estames com filete simples, com inserção dorsifixa, com presença de tricomas glandulares com pedúnculo uni ou bicelular bastante alongado, com colar curto e cabeça secretora multicelular formada por quatro células (tipo V) (figura 7-H). A antera (figura 7-G) possui duas tecas produtoras de grãos de pólen tricolpados (figura 7-I). O gineceu é bicarpelar e bilocular (figura 7-J). Apenas em um dos lóculos há o desenvolvimento de óvulo (figura 7-K). A base do ovário é abaulada, formando um disco nectarífero ao longo de toda a circunferência do ovário (figura 7-L).

As características morfométricas descritas neste estudo estão em consonância com a descrição realizada para o gênero *Stachytarpheta* por Atkins (2005) que descreve a corola como um tubo estreito com os lóbulos se espalhando, geralmente constituído por cinco pétalas, os estames do gênero são adnatos ao tubo da corola. A autora sugere ainda que devido o estigma estar no interior do tubo e este ser estreito, indica que a polinização deve ser realizada por polinizadores de língua longas, afim de alcançar no néctar presente no fundo do tubo.

A presença de papilas na epiderme das flores tem como função a conversão de raios luminosos para o interior do mesofilo, possibilitando assim, que haja a continuidade do processo de absorção de luz e de estímulos luminosos, principalmente em regiões de sombreamento, em que a energia luminosa é limitada (BONE *et al.*, 1985; FAHN, 1990).

Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos são uma ferramenta importante para detecção de substâncias em plantas medicinais, a resposta dos testes histoquímicos em *S. cayennensis* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Histoquímica em folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl em resposta ao ambiente de cultivo

Região	Substância				
	Composto fenólicos	Terpenos	Polissacarídeos	Lipídeos	Alcaloides
Epiderme adaxial	+	+	-	-	-
Epiderme abaxial	++	+	-	-	-
Parênquima clorofilado esponjoso	++	+	-	-	-
Parênquima clorofilado paliçádico	+	+	-	-	-
Tricomas tectores	++	+	+	-	-
Tricomas glandulares	++	-	+	-	-
Córtex da nervura principal	+	-	-	+	-
Flor	++	nt	nt	nt	nt

++ presença em maior quantidade; + presença; - ausência; nt não testado.

Fonte: da autora

Devido à complexidade do metabolismo vegetal, diversos compostos advindos do metabolismo especializado podem ser secretados pelas plantas. Tais metabolitos vêm sendo detectados com o intuito de sua utilização para diversas finalidades,

dentre elas a farmacêutica, devido a suas ações terapêuticas. As substâncias vegetais, podem ser sintetizadas e/ou acumuladas no interior das células para posterior eliminação, devido a isso, uma mesma substância pode ser detectada por meio da histoquímica em diversas estruturas (ASCENÇÃO, 2007).

Além disso, a detecção da natureza do composto, bem como seu local de produção e armazenamento torna-se fundamental para melhor manejo das plantas medicinais, devido a adequação nas ferramentas para que haja otimização na produção do composto químico ou da classe de interesse, reduzindo assim a perda desses compostos ainda no campo (MING, 1994).

Paes (2011) em seu estudo com *S. cayennensis* identificou por meio de teste histoquímico substâncias como lipídeos, polissacarídeos (pectinas estruturais) e compostos fenólicos, que corroboram com os resultados encontrados neste estudo, contudo, terpenos não foram detectados. Almeida (2014) detectou em sua análise fitoquímica a presença de compostos fenólicos (taninos condensados e flavonoides) e outros compostos nas folhas de *S. jamaicensis*. Hammer (1993), Lorenzi e Matos (2002) destacam que a espécie possui composição química variada com presença de compostos fenólicos, saponinas, glicosídeos, dentre outras.

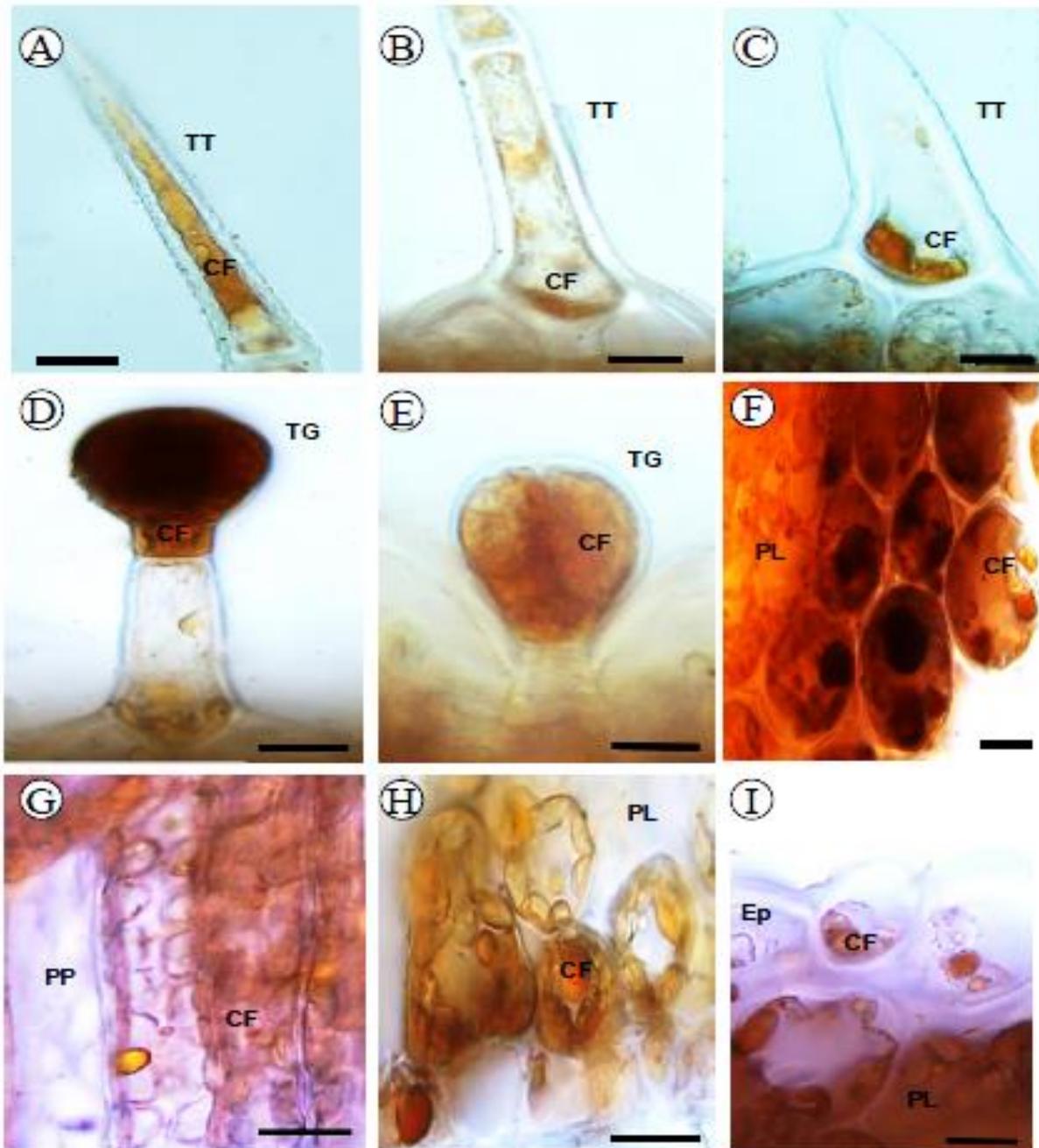
Os testes histoquímicos detectaram a presença de compostos fenólicos na epiderme abaxial e adaxial (figura 8-I), tricomas do tipo I, II, III e IV (figuras 8- A, B, C, D e E), mesofilo (figura 8-F, G e H). Foi detectada ainda a presença de compostos fenólicos nas diferentes peças florais (figura 7).

Os compostos fenólicos são substâncias químicas oriundas do metabolismo especializado das plantas, constituindo um grupo amplo e heterogêneo, sendo biossintetizados principalmente na rota do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estes compostos possuem diversas funções como, proteção contra o ataque de patógenos, proteção de tecidos superficiais pelos raios ultravioletas pela absorção dos raios prejudiciais sem a interferência nos benéficos para a fotossíntese (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso, estes compostos presentes nas plantas medicinais conferem sua ação terapêutica, principalmente atribuída a sua capacidade antioxidante, através do sequestro de radicais livres (D ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Terpenos (óleos essenciais) foram detectados histoquimicamente por meio de pequenas gotículas de óleo em todo mesofilo (figura 9-C), e ainda em gotas com maior volume na base dos tricomas tectores (figura 9- A), não sendo encontrados

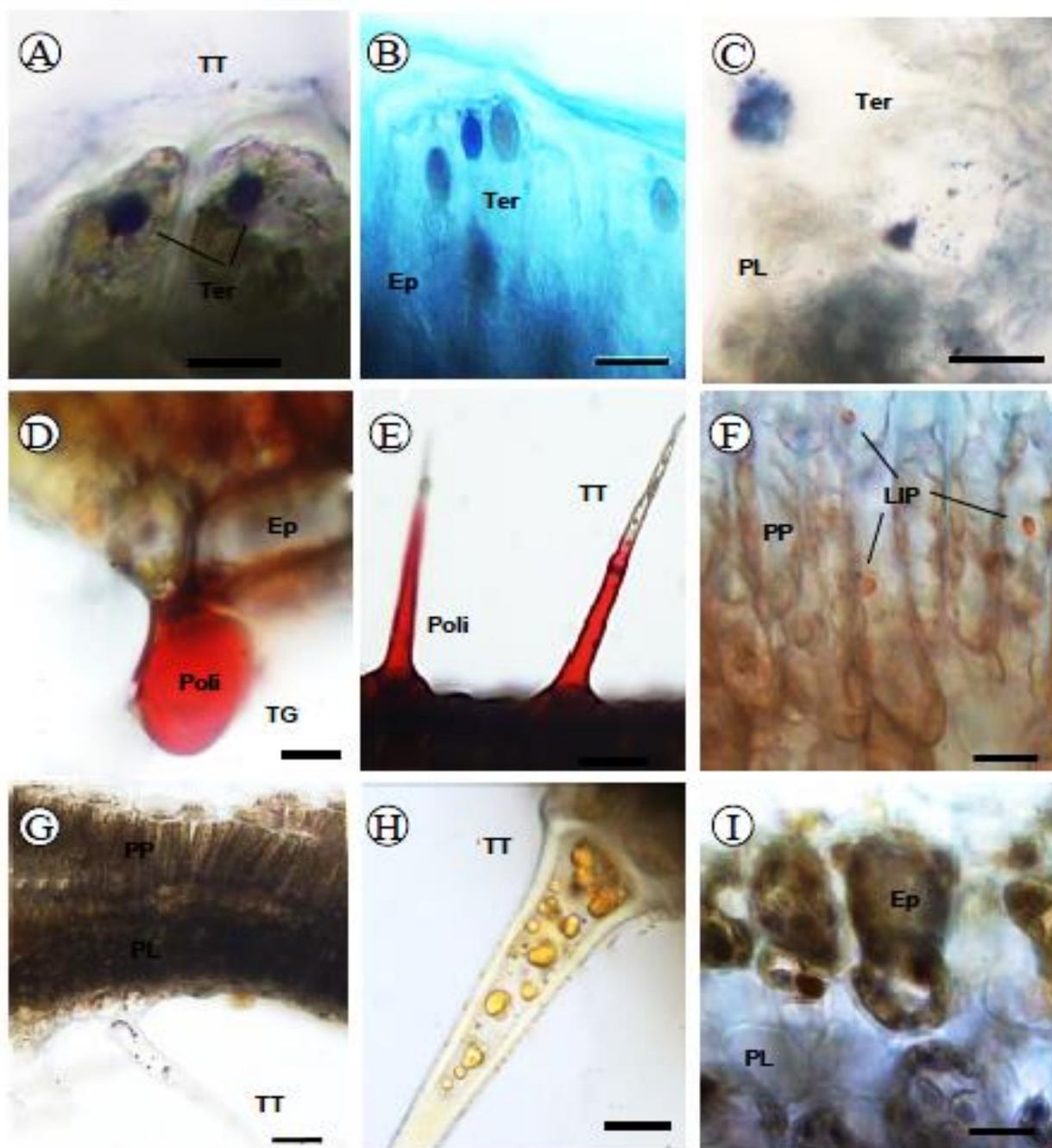
nos tricomas glandulares. Foram observados ainda a presença de terpenos em células epidérmicas (figura 9-B). Os terpenos possuem diversas funções nos organismos vegetais, podendo atuar como atrativo de polinizadores, mas também para a repelência dos mesmos, no controle de agentes patogênicos. Além disso podem ser utilizados também para fins medicinais, todavia, não foram encontrados relatos na literatura do emprego dos terpenos presentes em *S. cayennensis* como finalidade terapêutica.

Figura 8- Caracterização histoquímica das principais classes de metabolitos secundários presentes no secretado em diferentes sítios de produção em folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.



A e B- Compostos fenólicos (tricoma tector ápice, tricoma tector base) (15 μ m); C- Tricoma tector unicelular (15 μ m); D- Compostos fenólicos (tricoma glandular multicelular) (15 μ m); E- Compostos fenólicos (tricoma glandular unicelular) (15 μ m); Compostos fenólicos: F-bordo foliar (15 μ m); G- mesofilo (15 μ m); H- detalhe de células parenquimáticas (15 μ m); I- epiderme (15 μ m). Ep=epiderme, PP=parênquima paliçádico, PL=parênquima lacunoso, TT=tricoma tector, TG=tricoma glandular, CF=compostos fenólicos.

Figura 9- Caracterização histoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes no secretado em diferentes sítios de produção em folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.



A e B- Terpenos (base do tricoma tector, células da epiderme) (15 μ m); C- Terpenos (gotículas de óleo no mesofilo) (15 μ m); D e E- Polissacarídeos (tricoma glandular e tector) (15 μ m); F- Lipídeos (15 μ m) e G- Alcaloides (mesofilo sem aplicação de reagente (0,6 μ m), tricoma e epiderme (15 μ m)). Ep=epiderme, PP=parênquima paliçádico, PL=parênquima lacunoso, TT=tricoma tector, TG=tricoma glandular, Ter= terpenos, Poli= polissacarídeos, Lip= lipídeos.

Foi identificado a presença de polissacarídeos na epiderme abaxial e adaxial, e ainda em tricomas glandulares (figura 9- D) e tectores (figura 9-E). Os polissacarídeos têm importante função estrutural, atuam conferindo forma e dando sustentação a diversas estruturas, podendo ainda permitir fluxo de água pela parede (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Foi identificada a presença de cutícula delgada nas folhas de *S. cayennensis*, através do teste histoquímico aplicado, a presença de substâncias de natureza lipídica foi detectada somente nas células do córtex da nervura e algumas células do parênquima (figura 9-F).

Fenólicos totais

A classe de maior interesse medicinal de *S. cayennensis* são os compostos fenólicos. As realizações das análises evidenciaram grande quantidade desta classe por todo mesofilo foliar bem como em suas flores. Devido a isso, foi realizada a quantificação do teor.

As concentrações médias de fenólicos totais quantificadas em amostras de *S. cayennensis*, através da equação $y = 0,01x - 0,02$ com coeficiente linear de $R^2 = 0,99$, obtida da curva de calibração preparada com a solução de ácido gálico. Os valores de absorbância obtidos nas leituras, foram substituídos nesta equação, determinando o conteúdo de fenólicos totais por amostra, que variou de 91,18 a 5381,17 mg de ácido gálico, por 100 gramas de matéria seca. O teor médio de compostos foi de 2037,30 mg de ácido gálico/100 gramas de matéria seca, com desvio padrão de 1397,48 e coeficiente de variação- CV (%) de 69.

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados por meio de diversas rotas nas plantas, podendo ser encontrados, portanto em diversas partes do vegetal e em quantidades variadas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A alta concentração encontrada nas folhas de *S. cayennensis* corrobora com a análise histoquímica realizada, em que a substância foi detectada em todas as regiões avaliadas.

A variabilidade nos resultados obtidos na quantificação dos compostos fenólicos evidenciada pelo coeficiente de variação das amostras, pode ser atribuído a diferença genética inerente a espécie, que pode haver entre os indivíduos, uma vez que plantas deste estudo são provenientes de sementes. Segundo Morais (2009) a produção de compostos pode ser influenciada por fatores ambientais e

genéticos, bem como da interação entre eles, pois pode haver redirecionamento de rotas metabólicas ocasionando em variações no volume do metabólito produzido.

O valor médio encontrado no presente estudo para as amostras avaliadas é superior ao valor encontrado por Lima *et al.* (2013) em seu estudo com nove diferentes espécies de plantas medicinais, dentre elas *S. cayennensis*, em que o resultado obtido em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa seca foi de $142,49 \pm 1,38$.

Diversos estudos relatam a utilização do extrato das folhas de *S. cayennensis* para fins terapêuticos, principalmente pela presença de compostos fenólicos nesses extratos. Shapovall *et al.* (1998) em seu estudo visou fornecer explicação científica para o uso popular dos extratos como anti-inflamatórios, em que sua eficácia foi comprovada, e ainda chegaram a conclusão do baixo efeito tóxico nas doses utilizadas. Esses autores atribuíram a ação terapêutica a presença da ipolamida e de fenilpropanoides.

O verbascosídeo caracterizado por sua ação antiinflatória e antiulcerogênica (PENIDO *et al.*, 2006) e com eficácia comprovada para a o tratamento da leishmaniose tegumentar (MAQUIAVELI *et al.*, 2016), esta substância é classificada como um fenilpropanoides, cujo metabolismo origina compostos fenólicos (GARCÍA; CARRIL, 2011).

2.3 CONCLUSÃO

A descrição anatômica das folhas e flores seguiram as características encontradas para o gênero. Através dos testes aplicados foram identificadas as principais classes de metabólitos especializados em diferentes regiões do mesofilo foliar e flores, somente alcaloides não foram encontrados. Foi observada a presença de cutícula delgada nas folhas. Terpenos foram detectados em baixas quantidades no teste aplicado. Compostos fenólicos estão dispersos por todo o mesofilo foliar, bem como nos tricomas e nas peças florais. A quantidade de compostos fenólicos encontrados corrobora com sua ação medicinal ser atribuída principalmente a esta classe.

REFERÊNCIAS

- AOYAMA, E. M.; LABINAS, A. M. Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, p. 365-386, 2012.
- ALMEIDA, L. C. Aspectos morfoanatômicos e farmacognósticos de “gervão” *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (verbenaceae). 2014. Dissertação (Programa de Pós-graduação Em Recursos Genéticos Vegetais) -Universidade Estadual de Feira de Santana. 55 f. 2014.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Lisboa: Faculdade de Ciências de Lisboa**, p. 19-28, 2007.
- ATKINS, S. O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) no Brasil. **Kew Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 161, 2005.
- BARBOSA, J. M., GOEDERT, D.; SANTOS, M. B.; LOIOLA, M.; MARTINS, T. K.. Tricomas glandulares conferem defesa contra herbivoria em *Clidemia* sp. (Melastomataceae). **Livro do curso de campo “Ecologia da Mata Atlântica” (G. Machado & PIKL Prado, eds.). Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2010.
- BONE, R. A.; LEE, D. W.; NORMAN, J.M. Células epidérmicas funcionando como lentes em folhas de plantas sombreadas de florestas tropicais. **Ótica aplicada**, v. 24, n. 10, p. 1408-1412, 1985.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H. D.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. especial, 2000
- CALZADA-SANCHEZ, E. V.; AGUILAR-RODRIGUEZ, S.; LOPEZ-VILLAFRANCO, M. E.; AGUILAR-CONTRERAS, A. Anatomía de hoja y tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México. **Bot. sci**, México , v. 92, n. 4, p. 469-480, 2014 .
- CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville]. **Ciência e Agrotecnologia** 2009; 33(2): 385-390.

CLARK, G.; CONN, H. J. **Staining procedures used by the Biological Stain Commission.--**. Published for the Biological Stain Commission by Williams & Wilkins, 1973.

CORRÊA, P. G.; PIMENTEL, R. M. D. M.; CORTEZ, J. S. D. A.; XAVIER, H. S. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 3, p. 54-57, 2008.

D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polifenóis, fontes alimentares e biodisponibilidade. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**, vol.D, n.258, p. 1338-1340, 1964.

DI STASI, L. C. 1996. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP. 230 p.

DICKISON, W.C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Academic Press, USA.

DORES, R. G. R. das. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2007. 347 p. 2007. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FAHN, A. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford. 4 ed. 1990.

FAHN, A.; CUTLER, D.F. 1992. Xerophytes. Gebrüder Borntraeger, Berlim.

FERREIRA, E. Q. **Pharmaceutical composition on the basis of *stachytarpheta sp.*, a process for obtaining the same and its use for treating vitiligo**. U.S. Patent Application n. 12/527,242, 4 fev. 2010.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v.44, p.153-159, 1981.

GABE, M. **Técnicas histológicas**. Masson e Cie, 1976.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GERRITS, P.O. **The application of glycol methacrylate in histotechnology: some fundamental principles.** Netherlands: Department of Anatomy and Embryology, State University of Groningen, 1991. 80p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

IDU, M.; ERHABOR, J.O.; ODIA, E.A. Estudos morfológicos e anatômicos da folha e caule de algumas plantas medicinais: *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. e *S. cayennensis* (LC Rich) Schau. **Folhetos Etnobotânicos**, v. 2009, n. 11, p. 9 de 2009.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1940. 523p.

LIMA, W. Q. F.; PEREIRA, T. C. D.; PEREIRA, M. G.; BRITO, N. J. N. D.; ZAMPIERON, R. G.; SILVA, G. A. D. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. **FACIDER-Revista Científica**, v. 2, n. 2, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MAQUIAVELI, C.D.; OLIVEIRA, E.Sá.A.M.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, E.R. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonenses* via parasite arginase inhibition. **Journal Ethnopharmacol.** v. 192, p. 108-113, 2016.

MARQUES, L. C. 1999. In: SIMÕES, C. *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. cap. 14. p. 259-289.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford University Press, London, vol. 1., 2.ed., 1988.

MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v.12, p.9-3, 1994.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE).** Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009.

O'BRIEN, T.; FEDER, N.; MCCULLY, Mi E. Coloração policromática das paredes celulares das plantas pelo azul de toluidina O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OKEKE, C. U.; IROKA, C.F.; IZUNDU, A.I.; OKEREKE, N.C.; ONWUASOEZE, C.I.; NYANANYO, B.L. Estudos anatômicos comparativos sistemáticos de folhas e pecíolos do gênero *Stachytarpheta* encontrados em Awka, Nigéria. **Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 4, p. 82-84, 2015.

PAES, L.S. **Aspectos estruturais de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (pobre velho), *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl (gervão), *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M King & H. Rob.(japana) numa perspectiva micológica e fitoquímica**. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas. 122f. 2011.

PEARSE, A. G. E. Carboxylic ester hydrolases. **Histochemistry**, p. 761-807, 1972.

PENIDO C.; COSTA K.A.; FUTURO D.O.; PAIVA S.R.; KAPLAN W.A.; FIGUEIREDO M.R.; HENRIQUES M.G. Anti-inflammatory and Anti-ulcerogenic Properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 104, n. 1-2, p. 225-233, 2006.

RODELLA, R. A.; PIRES, A. I.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S. Anatomia comparativa foliar e caulinar de duas espécies daninhas de *Merremia* (Convolvulaceae). **Científica**, v. 21, n. 2, p. 345-353, 1993.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v 61, p.33-36, 1972.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 35, n.2, jul.-dez., p 377 - 383, 2004.

SCHAPOVAL, E. E. S.; VARGAS, M. R. W.; CHAVES, C. G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 53-59, 1998.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, 183-194 p., 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. [14] Análise do total de fenóis e outros substratos de oxidação e antioxidantes por meio do reagente folin-cocalocal. In: **Métodos em enzimologia** . Imprensa acadêmica, vol. 299, p 152-178, 1999.

STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. v. 9, junho 2008, 2001.

TAIZ, L; ZEIGER, E., MULLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 6 ed., 2017.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M. R.R. Botânica organografia: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas. 4ª ed. Viçosa: UFV, 2006. 124p.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado– (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), 16 p, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review** (No. WHO/TRM/98.1). Geneva: World Health Organization, 1998.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **Iheringia. Série Botânica.**, v. 59, n. 2, p. 173-178, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fenológico da espécie permite a compreensão do comportamento da espécie para a área estudada, possibilitando uma melhor caracterização da dinâmica de alocação e distribuição de recursos pela planta em resposta as variações climáticas ambientais.

A precipitação tem influência direta sobre as fenofases da espécie, o que possibilita a aplicação de manejos que mantenham as folhas, já que é nelas que se concentram os compostos de interesse. Além disso, a senescência é influenciada pela queda na temperatura, estabelecendo para algumas condições climáticas período ideal de cultivo, com ponto de colheita ideal antes do inverno. Para as condições do presente estudo o teor de compostos fenólicos foi elevado, podendo fornecer parâmetros para o cultivo da espécie afim de obtenção de altos teores de compostos.

A anatomia e histoquímica das folhas, possibilitou a caracterização interna e identificação dos locais de armazenamento dos compostos, que fornecem parâmetros para condução da espécie em diferentes regiões, e ainda corrobora com a utilização de toda parte aérea da planta para obtenção de compostos fenólicos. A descrição das flores neste estudo viabiliza o entendimento acerca da dinâmica reprodutiva da espécie e servirá de base para outros estudos complementares afim de caracterização complementar já que não foi encontrada na literatura a caracterização anatômica das mesmas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Ed. Hemus, 1993, 341 p.
- ATKINS, S. O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) no Brasil. *Kew Bulletin*, v. 60, n. 2, p. 161, 2005.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. 1a edicao. Sao Paulo: Ed. EDEL, 1986.
- BLANCO, L., VIGNOLI, T., REIS, G. M., MALVAR, D. D. C., PIRES, P. D. A., DE SOUZA, P. A., & CÔRTEZ, W.D.S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista Universidade Rural, Série Ciência e vida.**, v. 25, n.1, p.78-84, 2005.
- CAITANO, V.C.; FUTURO, D.O.; KAPLAN, M.A.C.; Etnofarmacologia de *Stachytarpheta cayennensis* Vahl. In: Simpósio de plantas medicinais do brasil, 14., 1996, Florianopolis. **Anais**. Res. 0.66, p.63.
- D'EÇA NEVES, F.F.; MORELLATO, P.C. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.1, p.99-108,2004.
- DIAS FILHO, M.B. How is fecundity affected by mowing in the tropical weed *Stachytarpheta Cayennensis* (Verbenaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 29, n. 11,p. 1675-1679, 1994.
- DIAS, H.C.T. **Fenologia de quatro espécies arbóreas e variação temporal e espacial da produção de serrapilheira em uma área de floresta estacional semidecidual montana em Lavras-MG**. 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FERNANDES, B. F.; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, M. R., ALVES, A. A.; BIESKI, I. G. C. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de

saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, 2019.

FERREIRA, E. Q. **Pharmaceutical composition on the basis of stachytarpheta sp., a process for obtaining the same and its use for treating vitiligo**. U.S. Patent Application n. 12/527,242, 4 fev. 2010.

FIRMO, W. D. C. A.; MENEZES, V. D. J. M.; PASSOS, C. E. C; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, dez 2011.

FLORA DO BRASIL. *Verbenaceae na Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

FOURNIER, L.A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v.24, n.4, p.422-3, 1974.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, nº. 2, 374-381, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS); BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 2014.

PIO CORREA, M.; **Dicionário das plantas úteis ao Brasil**. Ministerio de Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Vol III, pag. 395, 1984.

SILVA, S. C. M.; TOZIN, L.R.S.; RODRIGUES, T. M. Morphological and histochemical characterization of secretory sites of bioactive compounds in *Lantana camara* L. (Verbenaceae) leaves. **Botany**, v. 94, p. 321-336, 2016.

STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. v. 9, junho 2008, 2001.

TOZIN, L.R.S.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichomes in the tree-basil (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae): Morphological features with emphasis on the cytoskeleton. **Flora**, v. 259, p. 151459, 2019.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.