

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta documento será disponibilizado somente a partir de 23/02/2024.

Influência do excesso de cobre e zinco nos aspectos estruturais
e funcionais de *Cuphea calophylla* Cham. & Schldl.
(Lythraceae) com ênfase no sistema secretor

Diana Pacheco Seixas

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade de Plantas.



BOTUCATU – SP
2022



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Influência do excesso de cobre e zinco nos aspectos estruturais
e funcionais de *Cuphea calophylla* Cham. & Schldl.
(Lythraceae) com ênfase no sistema secretor

Aluna: Diana Pacheco Seixas

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues

Coorientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fernandes Boaro

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade de Plantas.

BOTUCATU – SP
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Seixas, Diana Pacheco.

Influência do excesso de cobre e zinco nos aspectos estruturais e funcionais de *Cuphea calophylla* Cham. & Schltdl. (Lythraceae) com ênfase no sistema secretor / Diana Pacheco Seixas. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Tatiane Maria Rodrigues
Coorientador: Carmen Sílvia Fernandes Boaro
Capes: 2030203

1. Anatomia vegetal. 2. Estresse oxidativo.
3. Fotossíntese. 4. Metais - Toxicologia.

Palavras-chave: Anatomia vegetal; Estresse oxidativo;
Estruturas secretoras; Fotossíntese; Metais tóxicos.

“Dedico este trabalho à minha família que se fez presente e me apoiou em cada etapa; em especial o dedico à Ana Maria Mugnatto Pacheco (minha avó), que infelizmente não pode ver em vida a conclusão deste, mas ela sempre esteve e sempre estará ao meu lado.”

Agradecimentos

A **Deus** pela oportunidade e força para a conclusão deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** - pelo auxílio financeiro para a realização do trabalho (código de Financiamento 001).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq** pelo suporte financeiro para este estudo (Edital Universal – Processo 431738/2018-1).

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,** Câmpus de Botucatu, e ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica),** pela estrutura e oportunidade.

À **Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues** pela oportunidade, orientação, auxílio e ensinamentos em anatomia vegetal; e, também, pela confiança durante este período.

À **Profa. Dra. Carmen Sílvia Fernandes Boaro** pela coorientação e por me auxiliar com o delineamento experimental e com as análises em fisiologia vegetal.

À **Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques** pela disponibilidade, auxílio e toda contribuição para as análises em cromatografia líquida.

Ao **Dr. Felipe Giroto Campos** por auxiliar com o delineamento experimental, montagem do experimento, análises dos resultados em fisiologia vegetal e análises químicas.

Ao **Ruan Serafim da Silva,** aluno de Iniciação Científica, pelo companheirismo e pela colaboração ativa na realização do trabalho experimental e do trabalho em campo.

À **Dra. Taciana Barbosa Cavalcanti** da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA pela identificação da espécie vegetal do trabalho.

À **Dra. Poliana Ramos Cardoso,** pesquisadora R&D (Innovation Team) na Oxiteno S/A pelo auxílio com a metodologia de histolocalização de peróxido de hidrogênio.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica,** Unesp – Botucatu, pelo processamento de amostras para estudos ultra-estruturais.

Ao **Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCMat) – UNESP Sorocaba,** pelas análises em MEV-EDS, em especial agradeço à **Profa. Dra. Elidiane Cipriano Rangel** e a técnica **Gabrielly Ivanof** por todo auxílio e contribuição.

Aos membros da banca de qualificação, **Profa. Dra. Rosani do Carmo de Oliveira Arruda,** **Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto** e **Profa. Dra. Elizabeth Orika Ono,** por terem discutido e contribuído para qualidade do trabalho.

Aos membros da banca da defesa, **Profa. Dra. Elizabeth Orika Ono,** **Prof. Dr. Luiz Ricardo dos Santos Tozin,** **Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim,** **Profa. Dra. Juliana Villela Paulino** e aos suplentes, por aceitarem o convite para contribuir com a qualidade do trabalho.

Aos amigos da pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), a todos os membros do **LaPAV (Laboratório de Pesquisas em Anatomia Vegetal)** e aos membros do **Laboratório de Crescimento e Fisiologia Vegetal** pela amizade, agradável convívio, ensinamentos e enriquecedoras discussões; além de todo auxílio na montagem e manutenção do experimento.

Não posso deixar de agradecer as pessoas que não estão relacionadas diretamente ao meio acadêmico, mas que foram de suma importância para o trabalho, como o Senhor Ivo, funcionário da fazenda experimental da UNESP de São Manuel que nos auxiliou em todas as vezes que fomos à fazenda para as coletas das plantas.

E aos meus familiares (em especial a minha mãe Ana Beatriz Mugnatto Pacheco; meu pai Luiz Francisco Seixas; minha irmã Laize Pacheco Seixas; meus avós Márcio Pacheco e Ana Maria Mugnatto Pacheco; minha madrinha Maria Cristina Mugnatto Sousa; meu padrinho Paulo Fernando de Sousa) e aos meus amigos que contribuíram para este processo com todo apoio, suporte, companhia e força.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	1
Abstract	3
Introdução geral	5
Capítulo 1: Expanding knowledge and clarifying aspects on the secretory system in aerial vegetative organs of <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schltdl., Lythraceae	14
Capítulo 2: The structural and functional responses of <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schltdl. (Lythraceae) to excess of zinc and copper	41
Apêndices: equações para calcular as concentrações das substâncias químicas estudadas no capítulo 2 e cromatogramas.....	91
Considerações finais	96

Resumo

Áreas destinadas a atividade agropecuária frequentemente apresentam solos contaminados pelo excesso de elementos tóxicos, em especial Zinco (Zn) e Cobre (Cu). Em baixas concentrações esses elementos são micronutrientes essenciais para as plantas, porém, em excesso podem causar alterações na estrutura e funcionamento vegetal. *Cuphea calophylla* Cham. & Schlttdl. (Lythraceae) é uma espécie subarborescente nativa do Brasil popularmente utilizada no tratamento da hipertensão e na produção de saponáceos, sendo naturalmente encontrada em áreas ruderais e de pastagem. Esse trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre o sistema secretor de *C. calophylla* e investigar a influência do excesso de Zn e Cu em aspectos estruturais e funcionais dos órgãos vegetativos da espécie. Indivíduos ocorrentes em área de pastagem com excesso de Zn e Cu e em área preservada foram amostrados; plantas também foram submetidas ao excesso de Zn, Cu e Zn+Cu em condições hidropônicas. Amostras de raiz, caule e folhas foram processadas segundo técnicas usuais em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e transmissão; dados morfométricos foram obtidos ao microscópio de luz. Índices de trocas gasosas foram analisados usando analisador de gases por infravermelho (IRGA). O nível de estresse oxidativo foi mensurado por meio da quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica; moléculas de H₂O₂ foram histolocalizadas com 3,3-diaminobenzidina-DAB. A concentração de Zn e Cu nas estruturas secretoras foi detectada utilizando EDS-MEV. A composição química do extrato produzido pelo eixo vegetativo aéreo foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Emergências glandulares volumosas produtoras de substâncias fenólicas, mucilagem e lipídios foram observadas em caules e folhas. Células epidérmicas bicompartimentalizadas secretoras de compostos fenólicos e mucilagem foram observadas no limbo foliar. Hidatódios ocorreram no bordo do limbo foliar e foram aqui descritos pela primeira vez para o gênero. Plantas em área de pastagem e indivíduos submetidos ao excesso de Zn e/ou Cu em hidroponia apresentaram compactação do mesófilo foliar. Plantas mantidas sob excesso de Zn apresentaram maior densidade de células epidérmicas secretoras nas folhas, enquanto que plantas sob excesso de Cu produziram emergências glandulares com menor comprimento. Zn e Cu foram detectados nas emergências glandulares e nas células epidérmicas secretoras sugerindo o envolvimento do sistema secretor na eliminação do excesso desses metais. O excesso de Cu promoveu aumento dos espaços intercelulares nas raízes. Alterações nas membranas internas de mitocôndrias e cloroplastos foram observadas em plantas sob excesso de Zn. Marcação intensa para H₂O₂ foi detectada em folhas e raízes de plantas sob excesso de Zn e/ou Cu. Maior número de compostos químicos foi detectado em plantas sob excesso de Cu, porém a produção de ácido elágico e ácido gálico não

foi alterada com o excesso de Zn e Cu. Apesar do indicativo de estresse oxidativo nas raízes, plantas sob excesso de Zn mantiveram o metabolismo fotossintético, enquanto que plantas sob excesso de Cu tiveram redução na assimilação de carbono. Os resultados obtidos sugerem que *C. calophylla* é tolerante ao excesso de Zn e suscetível ao excesso de Cu. Considerando o aumento exponencial de áreas com solos contaminados por excesso de Cu e Zn devido ao avanço da agropecuária no Brasil, nossos resultados se tornam relevantes uma vez que geram subsídios para predições dos efeitos de ações antrópicas na estrutura e funcionamento dos vegetais, reforçando a importância dos esforços para o manejo e conservação de espécies vegetais nativas.

Palavras-chave: anatomia vegetal; estresse oxidativo; estruturas secretoras; fotossíntese; metais tóxicos; ultraestrutura.

Abstract

Areas used for agricultural activity often have soils contaminated by the excess of toxic elements, especially Zinc (Zn) and Copper (Cu). In low concentrations these elements are essential micronutrients for plants, however, in excess they can cause changes in plant structure and function. *Cuphea calophylla* (Lythraceae) is a subshrub species native to Brazil, popularly used in the treatment of hypertension and in the production of saponaceous, being naturally found in ruderal and pasture areas. This work aimed to expand the knowledge about the secretory system of *C. calophylla* and investigate the influence of Zn and Cu excess on structural and functional aspects of vegetative organs. Plants occurring in pasture areas with excess Zn and Cu and in preserved areas were sampled; plants were also subjected to excess Zn, Cu and Zn+Cu under hydroponic conditions. Root, stem and leaf samples were processed according to usual techniques in light microscopy and scanning and transmission electron microscopy; morphometric data were obtained under a light microscope. Gas exchange were measured using infrared gas analyser (IRGA). The level of oxidative stress was measured through the quantification of hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipid peroxidation; H₂O₂ molecules were histolocalized with 3,3-diaminobenzidine-DAB. The concentration of Zn and Cu in the secretory structures was detected using EDS-MEV. The chemical composition of the extract produced by the aerial vegetative axis was analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). Voluminous glandular emergences producing phenolic substances, mucilage and lipids were observed in stems and leaves. Bi-compartmentalized epidermal cells secreting phenolic compounds and mucilage occurred in the leaf blade. Hydathodes were present at the edge of the leaf blade and were here described for the first time for the genus. Plants in pasture areas and individuals subjected to excess of Zn and/or Cu in hydroponics showed leaf mesophyll compaction. Plants under Zn excess showed higher density of epidermal secretory cells in the leaves, while plants under Cu excess produced glandular emergences with shorter length. Zn and Cu were detected in glandular emergences and in the epidermal secretory cells, suggesting the involvement of the secretory system in the elimination of the excess of these metals. Excessive Cu promoted an increase in intercellular spaces in the roots. Structural changes in the inner membranes of mitochondria and chloroplasts were observed in plants under Zn excess. Intense staining for H₂O₂ was detected in leaves and roots of plants under excess Zn and/or Cu. A greater number of chemical compounds was detected in plants under Cu excess, however the production of ellagic acid and gallic acid was not altered even with Zn and Cu excess. Despite the indicative of oxidative stress in the roots, plants under Zn excess maintained the photosynthetic metabolism, while plants under excess of Cu reduced the carbon

assimilation. The results obtained suggest that *C. calophylla* is tolerant to Zn excess and susceptible to Cu excess. Considering the exponential increase in areas with soils contaminated by excess Cu and Zn due to the advance of agriculture in Brazil, our results become relevant since they generate subsidies for predictions of the effects of anthropic actions on the structure and functioning of plants, emphasising the importance of efforts for the management and conservation of native plant species.

Keywords: oxidative stress; photosynthesis; plant anatomy; secretory structures; toxic metals; ultrastructure.

Introdução geral

A expansão industrial, agroquímica e agropecuária, assim como o excesso de materiais descartados por indústrias e centros urbanos, aumentam excessivamente a contaminação de solos por resíduos potencialmente tóxicos. Neste contexto, encontra-se a contaminação dos solos através de metais tóxicos, os quais muitas vezes são dispersos no ambiente como resquício das atividades antrópicas e podem oferecer riscos aos seres vivos quando em altas concentrações (McBride 1994; Nagajyoti et al. 2010). Duffus, desde 2002, em parceria com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), defende a utilização da terminologia “metais tóxicos” para se referir a elementos metálicos que, dependendo da sua quantidade, podem ser nocivos aos seres vivos, o que faz entrar em desuso a terminologia “metais pesados”, visto que nem todos os metais que apresentam alta toxicidade são elementos com alta densidade atômica (maior que 4g/cm³).

Áreas rurais envolvidas com a agropecuária são, geralmente, caracterizadas pela presença de solos contaminados com metais tóxicos, em específico com acúmulo de Zinco (Zn) e Cobre (Cu) (Mantovi et al. 2003; Girotto 2007; Matias et al. 2010; Ambrosini et al. 2016). Este acúmulo se deve à utilização de pesticidas e outros agroquímicos em culturas vegetais (Marsola et al. 2005; Brunetti et al. 2011; Oliveira 2011; Girotto et al. 2013; Brunetto et al. 2014). Além da fertilização dos solos e dos defensivos agrícolas, estudos destacam que regiões utilizadas para pastagem e áreas destinadas à agricultura, que fazem uso da adubação orgânica proveniente de excremento de animais, tendem a apresentar maiores concentrações de Zn e Cu devido à adição de sais para a suplementação alimentar na ração dos animais de manejo (Mantovi et al. 2003; Girotto 2007; Matias et al. 2010; Broetto et al. 2014; Ambrosini et al. 2016; De Conti et al. 2016; Brennan et al. 2019; Scheid et al. 2019).

Zn e Cu são micronutrientes importantes para o desenvolvimento e funcionamento do organismo vegetal (Reeves e Baker 2000; Taiz e Zeiger 2017), atuando como cofatores enzimáticos em diferentes reações essenciais para o metabolismo das plantas (respiração e fotossíntese). Especificamente, o Zn está associado ao metabolismo de grupos fosfato (ATPases), atuando na manutenção da estrutura de ribossomos e no funcionamento da RNA-polimerase. Já o Cu participa diretamente do processo fotossintético através do transporte de elétrons no fotossistema I (Nagajyoti et al. 2010; Hossain et al. 2018; Chandrasekhar e Ray 2020).

Entretanto, o Zn e o Cu em altas concentrações podem provocar disfunções no metabolismo das plantas, alterando o desenvolvimento vegetal (Vangronsveld et al. 1997; Reeves e Baker 2000; Hossain et al. 2018; Hammerschmitt et al. 2020). A toxicidade causada

pelo excesso desses elementos é evidenciada em alterações morfológicas, anatômicas e funcionais nas plantas. Estudos demonstram que o excesso de Zn e Cu em solos contaminados geram espécies reativas ao oxigênio (ERO) no corpo vegetal, como o radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). As ERO são moléculas instáveis que apresentam oxigênio reduzido, portanto, são altamente reativas, pois buscam seu equilíbrio energético fazendo ligações com diversas moléculas orgânicas. Nessas interações, as ERO desconfiguram moléculas estruturais (ex. lipoproteicas) e ativam rotas enzimáticas levando a distúrbios em vias metabólicas essenciais como na fotossíntese e respiração devido ao estresse oxidativo gerado (Stadtman e Oliver 1991; Parry et al. 1994; Hossain et al. 2018; Hammerschmitt et al. 2020). Em específico, o Zn interfere diretamente no sistema de defesa antioxidante, inativando enzimas antioxidantes e promovendo o estresse oxidativo no corpo vegetal (Gratão et al. 2005). Já o aumento de Cu no organismo vegetal pode promover a produção de ERO de maneira excessiva por meio da reação de Feton, uma vez que o Cu^+ catalisa reações que aumentam a concentração de OH^- (Briat e Lebrun 1999).

De modo geral, o estresse proveniente do excesso de Zn e Cu pode reduzir as taxas de crescimento das plantas e promover alterações nas folhas como clorose, aparecimento de manchas, modificação da morfologia e da área foliar, aumento na emissão de fluorescência das moléculas de clorofila e aceleração da senescência, além de modificar rotas enzimáticas importantes (Taiz e Zeiger 2017; Hossain et al. 2018).

Sabe-se também que o estresse oxidativo em plantas expostas a solos contaminados pelo excesso de Zn e Cu pode levar a alterações anatômicas e subcelulares no corpo vegetal. Estudos descrevem que o excesso de Zn pode provocar a diminuição do volume de células epidérmicas e células do parênquima paliçádico e lacunoso, diminuindo os espaços intercelulares, provocando colapso de feixes vasculares e rompimento de células parenquimáticas do mesofilo, além de reduzir a quantidade de grãos de amido e de amiloplastos (Sridhar et al. 2005, 2007); em raízes, o excesso de Zn pode aumentar os espaços intercelulares do córtex (Kouhi et al. 2016; Somavilla et al. 2018). Já em situação de Cu em excesso, as plantas tendem a apresentar raízes com rupturas na epiderme e alterações na organização concêntrica das camadas de células parenquimáticas do córtex (Guimarães et al. 2016); no limbo foliar pode ocorrer inibição do alongamento de células do parênquima clorofiliano, além do aumento dos espaços intercelulares no mesofilo e aumento do número de cloroplastos nas células fotossintetizantes, os quais passam a apresentar grana mais desenvolvido (Bernal et al. 2006; Bini et al. 2012).

Embora os efeitos morfoanatômicos decorrentes do excesso de Zn e Cu sejam conhecidos na estrutura de algumas espécies vegetais (Sridhar et al. 2005, 2007; Ambrosini et al. 2016; Bini et al. 2012; Somavilla et al. 2018), estudos descrevem que as respostas ao excesso

de metais são muito particulares para cada espécie (Bini et al. 2012; Kouhi et al. 2016; Hossain et al. 2018). Além disso, a maioria dos estudos que avalia a toxicidade proveniente do excesso de metais é limitada a plantas alimentícias ou plantas modelos (Mantovi et al. 2003; Brunetti et al. 2011; Giroto et al. 2013; Kouhi et al. 2016; Schwalbert et al. 2019; Hammerschmitt et al. 2020). Neste sentido, pouco se sabe sobre a influência do excesso de metais tóxicos na morfologia, aspectos subcelulares e funcionamento de plantas nativas.

Em áreas de pastagens, espécies de gramíneas e leguminosas são amplamente utilizadas para o forrageio; entretanto, representantes de mais de 30 famílias botânicas são encontrados naturalmente dispersos nessas áreas, dentre eles representantes da família Lythraceae (Penso et al. 2009). *Cuphea* P. Browne é o maior gênero de Lythraceae, com cerca de 250 espécies distribuídas desde o leste dos EUA até o sul da Argentina (Amarasinghe et al. 1991; Graham e Graham 2014). No Brasil, espécies deste gênero são popularmente conhecidas como sete-sangrias e apresentam uma ampla distribuição, sendo seu principal centro de diversidade em áreas de Cerrado, muitas delas encontradas em regiões ruderais (Cavalcanti 1990).

Espécies de *Cuphea* produzem substâncias com propriedades medicinais (Amarasinghe et al. 1991; Das et al. 2018; Ramírez et al. 2018) com comprovada função antioxidante, além de auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão e na redução do colesterol (Lorenzi e Matos, 2002; Das et al., 2018; Ramírez et al. 2018; Santos et al. 2020). Além disso, essas espécies são ricas em ácidos graxos, sendo fonte de lipídeos para a produção de sabão, detergentes e lubrificantes (Thompson 1984; Phippen 2009). Estudos encontrados na literatura descrevem os sítios de compostos bioativos de espécies de *Cuphea* como sendo tricomas glandulares e células epidérmicas secretoras de mucilagem (Amarasinghe et al. 1991; Lusa e Bona 2011; Klider et al. 2020). Entretanto, faltam estudos detalhados focados na compreensão da morfologia e desenvolvimento do sistema secretor em espécies do gênero.

Cuphea calophylla Cham. e Schltld. é uma espécie nativa, subarborescente e ruderal, facilmente encontrada no cerrado paulista em campos, gramados, bordas de matas e em ambientes antropizados como pastagens e beiras de estradas (Lorenzi e Matos 2002; Lusa e Biase 2011). Utilizada na medicina popular para tratamentos de doenças como hipertensão (Lorenzi e Matos 2002; Ramírez et al. 2018), as propriedades medicinais de *C. calophylla* têm sido relacionadas com a produção de substâncias fenólicas detectadas em extratos do seu eixo vegetativo aéreo, as quais atuam diretamente como antioxidantes, dentre elas estudos destacam o ácido elágico e o ácido gálico (Ramírez et al. 2018; Klider et al. 2020; Santos et al. 2020). Além disso, há relatos sobre o potencial comercial dessa espécie para a produção de saponáceos (Thompson 1984).

Desse modo, conhecer os aspectos estruturais e funcionais de *C. calophylla* e a influência do excesso de Cu e Zn no desenvolvimento e funcionamento de seu eixo vegetativo é de grande relevância quando se considera: a) sua ampla distribuição no Brasil, em especial em áreas antropizadas; b) a importância do sistema secretor vegetal na produção de substâncias bioativas e sua utilização pela medicina popular e indústria farmacêutica; c) o avanço da agropecuária e o aumento das áreas ocupadas por solos contaminados pelo uso de pesticidas e fertilizantes químicos ou orgânicos no Brasil, em especial no interior paulista.

Esse trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre o sistema secretor do eixo vegetativo aéreo de *C. calophylla* e investigar a influência do excesso de Zn e Cu em aspectos estruturais e funcionais dos órgãos vegetativos. Os resultados obtidos foram organizados em dois capítulos redigidos no formato de artigos científicos. O primeiro capítulo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre o sistema secretor do eixo vegetativo aéreo de *C. calophylla*. O segundo capítulo, de cunho experimental, teve como objetivo analisar a influência do excesso de Zn e Cu nos aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos dos órgãos vegetativos de *C. calophylla* utilizando indivíduos ocorrentes naturalmente em áreas preservadas e áreas de pastagem e indivíduos cultivados em meio hidropônico em casa de vegetação. Nossos resultados geram subsídios para estudos com abordagem ecológica, taxonômica e farmacológica, dentre outras, além de trazerem importantes informações para predições dos efeitos de ações antrópicas na estrutura e funcionamento das plantas e para o manejo de espécies vegetais.

Referências bibliográficas

AMARASINGHE, V.; GRAHAM, S.A.; GRAHAM, A. Trichome morphology in the genus *Cuphea* (Lythraceae). **Botanical Gazette**, 152, p.77-90, 1991.

AMBROSINI, V.G.; SORIANI, H.H.; ROSA, D.J.; TIECHER, T.L.; GIROTTO, E.; SIMÃO, D.G.; MELO, G.W.B.; ZALAMENA, J.; BRUNETTO, G. **Impacto do excesso de cobre e zinco no solo sobre videiras e plantas de cobertura**. In: Calagem, adubação e contaminação em solos cultivados com videiras. Embrapa Uva e Vinho, p.91-110, 2016.

BERNAL, M.; RAMIRO, M.V.; CASES, R.; PICOREL, R.; YRUELA, I. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspension. **Physiologia plantarum**, 127, p.312-325, 2006.

BINI, C.; WAHSHA, M.; FONTANA, S.; MALECI, L. Effects of heavy metals on morphological characteristics of *Taraxacum officinale* web growing on mine soils in NE Italy. **Journal of Geochemical Exploration**, 123, p.101-108, 2012.

BRENNAN, R.F.; PENROSE, B.; BELL, R.W. Micronutrients limiting pasture production in Australia. **Crop and Pasture Science**, 70, p.1053-1064, 2019.

BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, series III, **Sciences de la vie**, 322, p.43-54, 1999.

BROETTO, T.; TORNQUIST, C.G.; BAYER C.; CAMPOS, B.C.; MERTEN, C.G.; WOTTRICH, B. Soils and surface waters as affected by long-term swine slurry application in oxisols of Southern Brazil. **Pedosphere**, 24, p.585-594, 2014.

BRUNETTI, G.; FARRAG, K.; ROVIRA, P.S.; NIGRO, F.; SENESI, N. Greenhouse and field studies on Cr, Cu, Pb and Zn phytoextraction by *Brassica napus* from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. **Geoderma**, 160, p.517-523, 2011.

BRUNETTO, G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C.A.; SCHMITT, D.E.; HEINZEN, J.; DE MORAES, M.P.; CANTON, L.; TIECHER, T.L.; COMIN, J.J.; GIROTTTO, E. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy Soil Science**. 60, p.609-624, 2014.

CAVALCANTI, T.B. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lythraceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 12, p.67-93, 1990.

CHANDRASEKHAR, C.; RAY, J.G. Plant Response to Excess of Copper in Soils: A Review. In: **Metal toxicity in plants**. New York: Nova Science Publishers, 2020.

DAS, A.; CHAUDARY, S.K.; BHAT, H.R.; SHAKYA, A. *Cuphea carthagenensis*: a review of its ethnobotany, pharmacology and phytochemistry. **Bulletin of Arunachal Forest Research**, 33, p.01-14, 2018.

DE CONTI, L.; CERRETA, C.A.; FERREIRA P.A.A.; LOURENZI, C.R.; GIROTTTO, E.; LOURENSINI, F.; TIECHER, T.L.; MARCHEZEN, C.; ANCHIETA, M.G.; BRUNETTO, G. Soil solution concentrations and chemical species of copper and zinc in a soil with a history of pig slurry application and plant cultivation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 216, p.374-386, 2016.

DUFFUS, J.H. "Heavy metals" - A meaningless term? *Pure and applied chemistry*, 5, p.793-807, 2002.

GIROTTI, E. **Cobre e zinco no solo sob uso intensivo de dejetos líquidos de suínos**. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, p.01-121, 2007.

GIROTTI, E.; CERETTA, C.A.; ROSSATO, L.V.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; SCHMATZ, R.; BRUNETTO, G.; SCHETINGER, M.R.C.; NICOLOSO, F.T. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 93, p.145-155, 2013.

GRAHAM, S.A.; GRAHAM, A. Ovary, fruit, and seed morphology of the Lythraceae. **International Journal of Plant Sciences**, 175, p.202-240, 2014.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional plant biology**, 32, p.481-494, 2005.

GUIMARÃES, P.R.; AMBROSINI, V.G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C.A.; SIMÃO, D.G.; BRUNETTO, G. Black oat (*Avena strigosa* Schreb.) growth and root anatomical changes in sandy soil with different copper and phosphorus concentrations. **Water Air Soil Pollution**. 227, n.192, 2016.

HAMMERSCHMITT, R.K.; TIECHER, T.L.; FACCO, D.B.; SILVA, L.O.; SCHWALBERT, R.; DRESCHER, G. L.; TRENTIN, E.; SOMAVILLA, L.M.; KULMANN, M.S.S.; SILVA, I.C.B.; TAROUÇO, C.P.; NICOLOSO, F.T.; TIECHER, T.; MAYER, N.A; KRUG, A.V.; BRUNETTO, G. Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, 259, n.108763, 2020.

HOSSAIN, M.A.; KAMIYA, T.; BURRITT, D.; TRAN, L.S.P.; FUJIWARA, T. (EDS.). **Plant macronutrient use efficiency: molecular and genomic perspectives in crop plants**. Academic Press, Elsevier Inc, 2018.

KLIDER, L. M. MACHADO, C.D.; ALMEIDA, V.P.; TIRLONI, C.A.S.; MARQUES, A.A.M.; PALOZI, R.A.C.; LORENÇONE, B.R.; ROMÃO, P.V.M.; GUARNIER, L.P.; CASSERIMO, N.S.; SILVA, D.B.; CAVALCANTI, T.B.; RAMAN, V.; KHAN, I.A.; JUNIOR, A.G.; BUDEL, J.M. *Cuphea calophylla* var. *mesostemon* (Koehne) SA Graham: A Whole-Ethnopharmacological Investigation. **Journal of Medicinal Food**, 24, p.394-410, 2020.

KOUHI, S.M.M.; LAHOUTI, M.; GANJEALI, A.; ENTEZARI, M.H. Anatomical and ultrastructural responses of *Brassica napus* after long-term exposure to excess zinc. **Turkish Journal of Biology**, 40, p.652-660, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.512, 2002.

LUSA, M.G.; BIASI, L.A. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 13, p.52-57, 2011.

MANTOVI, P.; BONAZZI, G.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, N. Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. **Plant and Soil**, 250, p.249-257, 2003.

MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 9, p.92-98, 2005.

MATIAS, J.L.; CERETTA, C.A.; NESI, C.N.; GIROTTO, E.; TRENTIN, E.E.; LOURENZI, C.R.; VIEIRA, R.C. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 34, p.1445-1454, 2010.

MCBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soil**. New York: Oxford University Press, p.406, 1994.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 8, p.199-261, 2010.

OLIVEIRA, E.A.B. **Avaliação de método alternativo para extração e fracionamento de substâncias húmicas em fertilizantes orgânicos**. Instituto Agrônomo de Campinas, 53, p.01-05, 2011.

PARRY, A.D.; TILLER, A.S.; EDWARDS, R. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, 106, p.195-202, 1994.

PENSO, S.; BAUER, M.O.; CHICHORRO, J.F.; GONDIM, C.A.; VASCONCELOS, L.V. Caracterização estacional de uma pastagem natural do cerrado Mato-Grossense submetida ao pastejo. **Ciência Animal Brasileira**, 10, p.124-134, 2009.

PHIPPEN, W.B. **Oil Crops**. New York: Springer Verlag, 4, p.544, 2009.

RAMÍREZ-ATEHORTÚA, A.M.; MORALES-AGUDELO, L.; OSORIO, E.; LARA-GUZMÁN, O.J. The traditional medicinal plants *Cuphea calophylla*, *Tibouchina kingii*, and *Pseudelephantopus spiralis* attenuate inflammatory and oxidative mediators. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.01-11, 2018.

REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M. **Metal-accumulating plants**. In: Raskin I, Ensley BD (eds) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. New York: Wiley, p.193-229, 2000.

SANTOS, M. C., TOSON, N. S., PIMENTEL, M. C., BORDIGNON, S. A., MENDEZ, A. S., & HENRIQUES, A. T. Polyphenols composition from leaves of *Cuphea* spp. and inhibitor potential, in vitro, of angiotensin I-converting enzyme (ACE). **Journal of ethnopharmacology**, 255, p.112781, 2020.

SCHEID, D.L.; SILVA, R.F.D.; SILVA, V.R.D.; ROS, C.O.D.; PINTO, M.A.B.; GABRIEL, M.; CHERUBIN, M.R. Changes in soil chemical and physical properties in pasture fertilised with liquid swine manure. **Scientia Agricola**, 77, e20190017, p. 01-10, 2019.

SCHWALBERT, R.; SILVA, L.O.; SCHWALBERT, R.A.; TAROUÇO, C.P.; FERNANDES, G.S.; MARQUES, A.C.; COSTA, C.C.; HAMMERSCHMITT, R.K.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F.T. Physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars to copper excess. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 91, e20190121, p.01-15, 2019.

SOMAVILLA, L.M.; SIMÃO, D.G.; TIECHER, T.L.; HAMMERSCHMITT, R.K.; OLIVEIRA, J.M.S.; MAYER, N.A.; PAVANELLO, E.P.; TRENTIN, E.; BELLES, S.W.; BRUNETTO, G. Structural changes in roots of peach rootstock cultivars grown in soil with high zinc content. **Science Horticulturae**, 237, p.1-10, 2018.

SRIDHAR, B.B.M.; DIEHL, S.V.; HAN, F.X.; MONTS, D.L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cu in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, 54, p.131-141, 2005.

SRIDHAR, B.B.M.; HAN, F.X.; DIEHL, S.V.; MONTS, D.L.; SU, Y. Effects of Zn e Cu accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. **Brazilian Plant Physiology**, 19, p.15-22, 2007.

STADTMAN, E.R.; OLIVER, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. **Journal of Biological Chemistry**, 266, p.2005–2008, 1991.

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

THOMPSON, A.E. *Cuphea* - a potential new crop. **Hort Science**, p.352-354, 1984.

VANGRONSVELD, J.; COLPAERT, J.V.; VAN TICHELEN, K.K. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental pollution**, 94, p.131-140, 1997.