

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

**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**

LUCILENE DA SILVA PAES

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

LUCILENE DA SILVA PAES

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração Produção Vegetal.

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA SILVIA DE MENDONÇA

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

P126a Paes, Lucilene da Silva

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/Lucilene da Silva Paes.-Manaus : UFAM, 2011.

122f.: il. color. ;

Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Silvia de Mendonça

1. Plantas medicinais- princípios ativos 2. Plantas medicinais-colonização fúngica I. Mendonça, Maria Silvia (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997) 633.88(043.2)

LUCILENE DA SILVA PAES

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 15 de dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar
Museu Paraense Emílio Goeldi.

Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas.

Profa. Dra. Juliana Mesquita Vidal Martínez de Lucena
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas

Profa. Dra. Jania Lilia da Silva Bentes
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Maria Sílvia de Mendonça, Orientadora
Universidade Federal do Amazonas

Aos meus pais, Lindalva Nogueira por ter me convencido que conhecimento é nosso tesouro mais precioso e a José pela dedicação e amor enquanto vida. Aos meus irmãos, em especial, a Nogueira (inspiração) e Lucimaura (companheira enquanto vivermos), às minhas filhas Larissa e Layla (minha vida), ao grupo de alunos da sala de pesquisa e alunos do IFAM (esperança e motivação) e a todos que não serão listados, mas guardados no coração pelo estímulo e apoio e dedicação durante mais uma etapa de aprimoramento de minha formação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido nesta vida uma segunda oportunidade de trilhar todos os níveis de ensino necessários à minha formação profissional.

À Universidade Federal do Amazonas, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Agronomia Tropical, por ter proporcionado a ampliação de meus conhecimentos na agronomia os quais são tão essenciais para a sobrevivência da humanidade.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas local onde foram desenvolvidas as principais atividades de meu trabalho.

À professora Dra. Maria Sílvia de Mendonça, pela orientação, por quem tenho profunda admiração como profissional, como orientadora e como uma grande companheira que tem colaborado para o meu crescimento profissional.

À coordenação do curso de Agronomia Tropical e ao administrativo Nascimento.

Aos colegas da turma de doutorandos 2007 (Nailson, Anísia, Angela, Beth, Aildo, Sônia, Albejamere) pelo acolhimento e confiança no início do curso. Aos mestres Francymary, Luzianne e Simone e aos futuros doutores Márcia Green e Gilson Sanches (companheiros de turma), Poliana Genovez e a Manoel Viana pelo suporte nas atividades do laboratório (LABAF-UFAM).

Aos amigos pelo apoio dia a dia: Viviane Gomes, João Neto, Cinara Calvin, Ofélia Gomes, Alessandra, Poliana Roversi, Rocha, Maria Anália, Andréa Barroncas, Chris Rocha, Mirian Cartonilho, Raimunda, Almerindo, Hilda Ferreira, Simone Rosas, Maristela.

Aos meus alunos da sala de pesquisa: Luana, Marlene, Marina, Bruna, Jany Fabia, Rose, Kate, Eduardo (Químico), Ricardo, Beatriz, Mário, Luís, Rafael, Fernando, Bernard pela dedicação, companherismo e pelo empenho em todos os pedidos solicitados que o corpo docente do curso e, em especial aos Professores Doutores: Renata Strozi (Universidade de Viçosa), Jânia Lilia, Paulo (EMBRAPA), Ari Hidalgo, (UFAM) Antenor (UFAM) pela forma

como repassaram o conhecimento durante as disciplinas. Aos professores que contribuíram para esclarecimento das metodologias: Ana Mena Barreto, Junior Ribeiro, Patrícia (INPA).

A equipe do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Museu Paraense Emilio Goeldi: Dr. Hilton Tulio Costi, MSc. Rolf Junior Ferreira Silva e Tarcymara Garcia.

Aos anjos disfarçados em pessoas: Lucimaura Cabral (irmã), Tereza Cristina (Professora UFAM), Sônia Lima (amiga e Professora IFAM), Maria Silvia de Mendonça (orientadora do MSc e Dr.), Rosicley Lourenço (Amiga), Cristina Bührnheim (Amiga), Flaviane Cabral (sobrinha) por terem me encaminhado para chegar até aqui.

À minha família a quem devo milhões de desculpas pela ausência em momentos que deveria estar presente, mas prometo que em breve não irão ouvir mais a frase: “quando o doutorado terminar”.

A todos que contribuíram e participaram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

As florestas tropicais representam fonte de recursos naturais resultante das interações ecológicas, principalmente entre planta e micro-organismos. Há tempos o produto do metabolismo secundário destes seres é utilizado pela indústria em virtude de seu potencial antimicrobiano. Este trabalho avaliou os aspectos estruturais anatômicos e histoquímicos associados à prospecção fitoquímica e micológica de três plantas medicinais, sendo elas: *Costus spicatus*, *Stachytarpheta cayennensis* e *Ayapana triplinervis*. Os resultados anatômicos mostram que *C. spicatus* possui folha anfi-hipoestomática, estômatos tetracíticos e tricomas tectores filamentosos; *S. cayennensis* apresenta folhas anfi-hipoestomáticas, estômatos diacíticos e anomocíticos, tricomas glandulares e tectores; *A. triplinervis* possui folha anfi-hipoestomática, estômatos anomocíticos, tricomas glandulares e tectores, ductos e aerênquima. A histoquímica e a prospecção química das três espécies indicaram a presença de substâncias tais como alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, taninos, heterosídeos cinogênicos e ácidos voláteis e amido. O isolamento dos fungos endofíticos evidenciou que *C. spicatus* apresenta maior taxa de colonização e os gêneros fúngicos mais frequentes nas três espécies foram: *Phacelomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

Palavras-chave: colonização fúngica, princípios ativos, estruturas secretoras.

ABSTRACT

**Structural mycological and phytochemistry perspective of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.,
Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl, *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King &
H.Rob.**

Rainforests represent a source of natural resources resulting from ecological interactions, especially among plant and microorganisms. There are times the product of the secondary metabolism of these beings is used by industry by virtue of its antimicrobial potential. This work has evaluated the structural aspects and there associated anatomical phytochemical survey of mycological and three medicinal plants, which are: *Costus spicatus*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Ayapana triplinervis*. The anatomical results show that *C. spicatus* has amphihypostomatic leaf, stomats tetracitic and filamentous tectores trichomes; *S. cayennensis* has amphihypostomatic leaf, diacíticos stomats and anomocitic and tectores and glandular trichomes. *A. triplinervis* has amphihypostomatic leaf, stomats anomocitics, glandular trichomes and tectores, ducts and aerênquima. The histochemistry and chemical prospecting of three species indicated the presence of substances such as alkaloids, phenolics, saponins, tannins, heterosídeos cinogênicos and volatile acids and starch. The isolation of endophytes showed that *C. spicatus* has highest rate of colonization and the fungal genera more frequent in three species were: *Phacelomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma*.

Keyword: fungal colonization, active principles, secretory structures.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos dos órgãos vegetativos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae)

Figura 1. Inflorescência de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.29

Figura 2. Ilustração dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. ...30

Figuras 3 -11. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 3. Epiderme em vista frontal, estômatos (est) (MEV) 4. Corte transversal da lâmina foliar com tricomas tectores (MEV). 5-11. Secção transversal da lâmina foliar de *Costus spicatus*. 5. Nervura mediana com feixe vascular central (fvc)) e hipoderme (hip). Epiderme adaxial (ead). Epiderme abaxial (eab). 6. Mesofilo; parênquima paliçádico (pp) e lacunoso (pl). 7. Cristais de oxalato de cálcio (cr). 8. Câmara subestomática (cs). 9. Feixe vascular central: xilema (xl), floema (fl) e calotas de fibras de esclerênquima (es), colênquima (co). 10. Alcaloides em regiões próximo aos feixes vasculares. 11. Compostos fenólicos na região do mesofilo. 33

Figuras 12 -14. Eletromicrografia de varredura de seções transversais do caule de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 12. Cilindro vascular (cv) e córtex (ct). 13. Feixes vasculares na região medular (fv) 14. Detalhe das bainhas foliares (bf).....35

Figuras 15-22. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 15. Secções transversais da haste: córtex (ct): epiderme (ep), endoderme (end), periciclo (pr). 16. Secção longitudinal da haste evidenciando estrias de Caspary (ec) na endoderme. 17-22. Secções transversais da haste: 17. Visão geral da haste 18. Compostos fenólicos em células da região cortical. 19. Células do córtex e cilindro vascular (cv) contendo alcaloides. 20. Células do cilindro vascular contendo mucilagem (mu). 21. Bainha pericíclica lignificada (es). 22. Parênquima medular contendo amido corado com lugol (am). 36

Figuras 23-32. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. Figuras 23-25. Secções transversais do rizoma. 23. Epiderme rizoma (branco). 24. Endoderme e Estrias de Caspary (ec). 25. Feixes vasculares (fv). 26. Idioblastos amilíferos (am). 27-32. Secções transversais da raiz. 27. Visão geral da raiz: pêlos radiculares (pr), córtex (ct), cilindro vascular (cv). 28. Detalhe da exoderme (ex) e dos meatos (me). 29. Cilindro vascular (cv): endoderme (end), Estrias de Caspary (ec). 30. Distribuição de amido nas células cilindro vascular e córtex. 31. Proteínas estruturais no cilindro vascular. 32. Células do cilindro vascular (cv) e córtex coradas em azul intenso indicando mucilagem. 39

CAPÍTULO II: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Figura 1. Visão geral de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl, destacando a inflorescência.....	56
Figura 2. Ilustração das partes vegetativas e reprodutivas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. Rp: Raiz primária, If: inflorescência, ne. Nectários extraflorais.	57
Figuras 3-12. <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. 3-4 Vista frontal das epidermes foliares (MEV), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg). 5-12. Secções transversais da lâmina foliar. 5. Tricoma tector unicelular. 6. Tricoma tector pluricelular filiforme. 7. Tricoma glandular tipo I evidenciando alcaloides na cabeça secretora. 8. Tricoma com reserva de lipídeos evidenciado pelo sudan IV. 8-10. Tricomas glandulares tipo II. 11. Tricoma glandular tipo III evidenciando mucilagem pela reação com o azul de metileno. 12. Tricoma glandular tipo IV, com reação positiva para alcaloide na região apical (cabeça secretora).	60
Figuras 13-21. Nectário extrafloral de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. 13. Aspecto morfológico do nectário. 14. Corte transversal evidenciando a estrutura do nectário extrafloral com região basal (rb), intermediária, região apical (ra). 15. Disposição do nectário sobre a lâmina foliar (MEV). 16. Vista frontal da região apical (MEV). 17. Vista frontal evidenciando presença de lipídeos na região central e paliçada, depressão central (dc) 18. Mucilagens estruturais e feixes vasculares duas camadas abaixo da epiderme (fv). 19. Compostos fenólicos na região apical. 20. Proteínas estruturais nas células colunares (cc). 21. Nectário extrafloral com reação para açúcares.....	62
Figuras 22-23. <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. 22. Vista frontal da epiderme tricoma tector filamentoso (tt). 23. Estômato anomocítico (es).....	63
Figuras 24-29. Secções transversais da lâmina foliar de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. 24. Epiderme e parênquima paliçádico (branco). 25. Epidermes com tricomas tectores (tt) e tricomas glandulares (tg) mesófilo evidenciando parênquima paliçádico (pp) e lacunoso (pl). 26. Cutícula (cut) da epiderme foliar. 27. Mesófilo com reservas de compostos fenólicos evidenciados pelo cloreto e férrico. 28. Nervura central com feixes vasculares (fv) feixes vasculares acessórios (fva). 29. Pecíolo.	65
Figuras 30-40. Secções transversais do caule de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. 30. Detalhes dos tricomas tectores (tt) glandulares (tg) nas células epidérmicas. 31. Distribuição das fibras perivasculares (fp) no córtex (ct) indicadas pela reação com fluroglucinol, floema (fl) e xilema (xl). 32. Visão geral do caule (MEV), medula (me), córtex (ct). 33. Branco (córtex e medula); 34 Alcaloides (al) nas células epidérmicas e nos tricomas evidenciados pelo reagente de Wagner. 35. Alcaloides (al) nos feixes vasculares 36. Amido (am) nas células do córtex. 37 Proteínas estruturais no floema. 38. Mucilagem nas células epidérmicas e córtex evidenciado pelo azul de metileno. 39. Tanino (ta) nos feixes vasculares evidenciados pela vanilina clorídrica. 40. Terpenoides do grupo carbonila (tp) em células epidérmicas e no córtex (ct).....	67

Figuras 41-44. Secções transversais da raiz principal de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 41. Vista geral da raiz. 42. Branco. 43. Alcaloides na endoderme e nos raios xilemáticos. 44. Compostos fenólicos no córtex. ct = córtex, me = medula, al= alcaloides, cf= compostos fenólicos..68

CAPÍTULO III: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob.

Figuras 1- 2. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 1. inflorescência. 2. ramos foliares.....85

Figura 3. Ilustração geral do hábito de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 87

Figuras 4-7. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 4. Vista frontal da epiderme adaxial. 5. Vista frontal da epiderme abaxial. 6. Cutícula evidenciada pelo corte transversal. Estômato (est), cutícula. 7. Epiderme em vista frontal (MEV) evidenciando depressões na epiderme (cut)..... 89

Figuras 8-13. Tricomas tectores e glandulares observados em secções transversais da folha de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 8. Corte branco evidenciando tricoma tector. 9. Tricoma tector na nervura central. 10. Tricomas digitiformes (branco). 11. Pectinas presentes em tricomas glandulares digitiformes. 12. Tricoma glandular perolado. 13. Tricoma glandular com reservas de lipídeos.....91

Figuras 14-19. Secções transversais da lâmina foliar de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 14. Mesofilo; parênquima paliçádico (pl), ductos (dc). 15. Nervura central; feixe vascular central (fvc). 16. Colênquima (col). 17. Pectina (pec) na parede celular das células epidérmicas visualizadas pelo vermelho de rutênio; clorofila (cl). 18. Lipídeos estruturais (lp) nas paredes celulares das células epidérmicas visualizadas pelo sudan IV. 19. Gotículas de lipídeos evidenciadas pelo sudan IV no mesofilo.94

Figuras 20-22. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 20 e 21 Secções transversais do caule (MEV), aerênquima (aer), córtex (ct), cilindro vascular (cv), fibras floemáticas (fp). 22. Secção longitudinal do caule evidenciando espaços aeríferos.....96

Figuras 23-28. Testes histoquímicos de secções transversais do caule em *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 23 células do córtex com alcaloides (al) e espaços aeríferos (aer); córtex (ct); 24. Mucilagens (mu) em células do córtex. 25. Terpenóides (tp) na região central próximo aos feixes vasculares. 26. Tanino (tn) nos feixes vasculares. 27. Resinas (re) na região dos feixes vasculares. 28. Compostos fenólicos na epiderme (ep) e córtex (ct).....97

Figuras 29-32. Secções transversais da raiz de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 29. Visão geral da raiz (MEV). 30. Endoderme na raiz principal. 31. Alcaloides nas células epidérmicas e no cilindro central. 32. Proteínas estruturais nos feixes vasculares98

TABELAS

CAPÍTULO I: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos dos órgãos vegetativos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae)

Tabela 1 Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas do material. 27

Tabela 2. Compostos secundários encontrado no extrato etanólico e aquoso de órgãos de subterrâneos (raiz+rizoma) e aéreos (caule e folhas) de *C. spicatus* (Jacq.) Sw. 40

CAPÍTULO II: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas de órgãos vegetativos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 54

Tabela 2. Compostos secundários encontrados no extrato etanólico e aquoso em raízes, caules e folhas de *S. cayennensis*. 69

CAPÍTULO III: Aspectos Estruturais, Histoquímicos e Fitoquímicos de órgãos vegetativos de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) (Asteraceae)

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas do material 83

Tabela 2: Compostos secundários encontrados no extrato etanólico e aquoso de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl). R.M.King & H. Rob. 99

CAPÍTULO IV: Fungos endofíticos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae) e *Costus spicatus* (Costaceae)

Tabela 1: Frequência (%) de fungos endofíticos em *Costus spicatus*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Ayapana triplinervis*, isolados de diferentes partes vegetativas. 112

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos dos órgãos vegetativos de <i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw. (Costaceae)	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO II: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl (Verbenaceae)	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	72

CAPÍTULO III: Aspectos Estruturais, Histoquímicos e Fitoquímicos de órgãos vegetativos de <i>Ayapana triplinervis</i> (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) (Asteraceae)	77
RESUMO	78
ABSTRACT	79
INTRODUÇÃO.....	80
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
REFERÊNCIAS	101
CAPÍTULO IV: Fungos endofíticos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl (Verbenaceae) <i>Ayapana triplinervis</i> (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae) e <i>Costus spicatus</i> (Costaceae)	105
RESUMO	106
ABSTRACT	107
INTRODUÇÃO.....	108
MATERIAL E MÉTODOS.....	110
RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
REFERÊNCIAS	115
CONCLUSÃO GERAL	119
ANEXOS	121

INTRODUÇÃO

As florestas tropicais possuem uma ampla riqueza em metabólitos secundários fruto da interação ecológica entre as espécies (Wink, 1988; Hartmann, 2004) acreditam que tais substâncias funcionam como agentes defensivos na luta contra predadores naturais (microrganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros).

O produto do metabolismo presente nas partes vegetativas pode ser armazenado em tecidos secretores especializados na forma individualizada nos idioblastos ou serem encontradas compondo estruturas multicelulares de tricomas, cavidades ou bolsas, ductos ou canais (Apezzato-da-Glória; Carmello-Guerreiro, 2006) que se distribuem ao longo das partes vegetativas e reprodutivas da planta.

O produto deste metabolismo supracitado constitui fonte de princípios ativos empregados tanto na medicina tradicional, como na produção de biomoléculas ativas com potencial no tratamento de doenças que para Takahashi e Lucas (2008) trata-se de substâncias com ações antimicrobianas as quais não se restringem apenas às plantas.

A produção e armazenamento dos compostos orgânicos podem sofrer variações quanto ao quantitativo e localização, pois de acordo com Alves (2001), a composição química dos vegetais é diretamente influenciada por fatores abióticos (fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica) e bióticos (interações e adaptações coevolutivas entre planta-planta, planta-animal e planta-microorganismos) de um determinado ecossistema.

Os micro-organismos endofíticos habitam o interior de tecidos vegetais e vem representando nas últimas décadas grande valor para a performance dos cultivares diante das relações estabelecidas entre planta-fungo (AZEVEDO et al., 2000). O produto desta interação constitui novas fontes alternativas de produtos naturais com amplas potencialidades

aplicáveis na medicina, na agricultura e na indústria, por suas propriedades como antibióticos, antimicóticos, imunossupressores e compostos anticâncer (STROBEL e DAYSE, 2003).

Estudos voltados aos aspectos estruturais de plantas tais como a caracterização anatômica, fitoquímica e micológica permitem a compreensão quanto à distribuição dos princípios ativos nas partes vegetativas permitindo a descoberta de possíveis produtores de moléculas bioativas derivadas de endofíticos, os quais são reconhecidos atualmente pela propriedade de produzir os mesmos produtos naturais presentes nas plantas como, por exemplo, a substância paclitaxel, um diterpenóide e famoso anticancerígeno que se encontra em *Taxus* spp. (planta) substância também isolada de *Taxomyces andreanae* (fungo endofítico de *Taxus brevifolia*) (SUFFNESS e WALL, 1995; STROBEL e DAISY, 2003).

Dentre os produtos já isolados destacam-se as leucocinostatina, isolada de *Acremonium* sp. (Strobel et al., 1999), isocumarinas de *Conoplea elegatula* (Findlay et al 1995), taxol de *Pestalotiopsis microspora* (Strobel et al., 1996) e esteróides de *Penicillium herquei* (Marinho et al., 2009), entre outros.

Para Neto et al. (2004), a biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa, sendo detentora de microrganismos endofíticos, ainda não classificados com representatividade genética, capaz de prover composto estruturalmente diversificado e de bioatividades pouco conhecidas.

As características morfoanatômicas de cada vegetal podem determinar a o processo de colonização, penetração e permanência dos fungos endofíticos, pois o mesmo se inicia pelas portas de entrada dos vegetais (estômatos, raízes, aberturas ou feridas causadas por insetos) (AZEVEDO, 2000). De acordo com Calo et al. (2006), a existência de tricomas tectores e glandulares nas superfícies foliares pode facilitar o processo de adesão das hifas e esporos fúngicos, contribuindo para o processo de colonização. As relações simbióticas entre fungos endofíticos com seus hospedeiros são complexas, principalmente nas regiões tropicais. Um

dos fenômenos que aparece registrado tanto nas zonas temperadas como nas tropicais é a especificidade dos endossimbiontes por tecidos vegetais particulares (GAITÁN, 2006).

Considerando que as plantas medicinais estabelecem relações com fungos endofíticos e que, de acordo com os caracteres de cada vegetal (apêndices foliares, produto do metabolismo secundário, estruturas secretoras, entre outros) podem influenciar no processo de colonização, penetração e permanência destes seres, realizou-se este estudo visando identificar principais gêneros fúngicos endofíticos presentes nas partes vegetativas, além de aspectos estruturais das plantas que possam favorecer ou não a presença destes seres nas partes vegetativas.

Diante do exposto, realizou-se a associação de aspectos anatômicos, fitoquímicos e micológicos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (pobre-velho), *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (gervão) e *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) de maneira a fornecer subsídios ao desenvolvimento de estudos agrônômicos, farmacológicos e químicos.

A apresentação do presente estudo foi realizada em quatro capítulos, dos quais os capítulos I, II, e III correspondem à avaliação anatômica, histoquímica e fitoquímica de órgãos vegetativos de cada espécie. O capítulo IV trata da identificação de fungos endofíticos nas partes vegetativas de cada espécie. Todos os artigos serão submetidos à Revista Brasileira de Plantas Medicinais.

REFERÊNCIAS

ALVES, H. M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n° 3, 2001. p.10-15.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438 p.

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. (Org.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariú: Embrapa, 2000. 308 p.

CALO, L.; GARCIA, I.; ROMERO, L.C. Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3-glucanase. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 14, p. 3911–3920, 2006.

FINDLAY, J. A.; BUTHELEZI, S.; LAVOIE, R.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.; MILLER, J.D. Bioactive isocoumarins and related metabolites from conifer endophytes. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 11, p. 1759-1766, 1995.

GAITÁN, M. A. G. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biologica Colombiana*, v. 11, n. 1, p. 3-20, 2006.

HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta*, v. 219, n. 1, p. 1–4, 2004.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; FILHO, E. S. Esteróides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Química Nova*. São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1710-1712, 2009.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletim Latino americano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69 -72, 2004.

STROBEL, G. A. et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, v. 142, p. 435-440, 1996.

STROBEL, G. A. et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*. v,17, p. 417-423. 1999

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUFFNESS, M. & WALL, M.E. in *Taxol: Science and Applications*, ed.Suffness, M. (CRC, Boca Raton, FL), 1995. p. 3–25.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Tag Theoretical and Applied Genetics*, v. 75, n. 2, p. 225-233, 1988.

**CAPÍTULO I: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos
dos órgãos vegetativos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae)**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos dos órgãos vegetativos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae)

RESUMO: As folhas de *Costus spicatus* são amplamente empregadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, entre elas: malária, hepatite e doença do aparelho urinário. O objetivo deste trabalho foi identificar aspectos da anatomia dos órgãos vegetativos (folha, caule, raiz e rizoma) associados à triagem fitoquímicas visando contribuir com informações relevantes para o desenvolvimento de estudos taxonômicos, agrônômicos, fisiológicos e farmacológicos. A análise anatômica por meio da microscopia óptica e de varredura evidenciou folha anfi-hipoestomática com estômatos tetracíticos e tricomas tectores filamentosos simples. O mesofilo é constituído por parênquima clorofiliano, que se divide em duas regiões intercaladas por cordão de fibras e feixes vasculares. O caule aéreo é do tipo atactostélico como no rizoma. A raiz em corte transversal é poliarca. Os testes histoquímicos indicaram a presença de amido, proteínas estruturais, alcaloides, cristais de oxalato de cálcio, nas principais estruturas vegetativas estudadas. A prospecção química com extratos etanólico e aquoso detectou presença de saponinas, taninos, alcaloides, flavonóides e heterosídeos cianogênicos.

Palavras- chave: anatomia, compostos secundários, plantas medicinais.

ABSTRACT: Structural aspects of vegetative organs there and phytochemicals of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). The leaves of *Costus spicatus* are widely employed in folk medicine for the treatment of various diseases, including: malaria, hepatitis and urinary tract disease. The goal of this work was to identify aspects of the anatomy of vegetative organs (leaf, stem, root and rhizome) associated with the fitoquímicas screen to contribute information relevant to the development of taxonomic studies, pharmacological, physiological and agronomic. Anatomical analysis by optical microscopy and scanning showed host sheet-hipoestomática, with estômatos tetracíticos and simple filamentous tectores trichomes. The mesophyll is composed of clorofiliano parenchyma, which is divided into two regions interspaced by rope fibers and vascular bundles. The air stem is of type atactostélico and rhizome. The root in cross-section is poliarca. There tests indicated the presence of starch, structural proteins, alkaloids, calcium oxalate crystals in the main vegetative structures studied. Chemical prospecting with etanólico aqueous extracts and detected the presence of saponins, tannins, alkaloids, flavonoids and cyanogenic heterosides.

Keywords: Anatomy: secondary compounds, medicinal plants

INTRODUÇÃO

Costus spicatus (Jacq.) Sw. é uma espécie herbácea com distribuição neotropical pertencente à família Costaceae (Specht et al., 2001; Specht & Stevenson, 2006; A.P.G III, 2009). Trata-se de uma planta perene, cespitosa, cuja parte aérea pode atingir 1,0 a 2,0 m de altura, ocorrem principalmente, na Mata Atlântica e região Amazônica (Lorenzi & Matos, 2008). As folhas são dispostas em espiral com prolongamento invaginante na base formando lígula, com inflorescência terminal, brácteas em espiral, densa, imbricadas, glabra, e vermelha (Maas, 1972; Petersen, 1890).

Em virtude da semelhança quanto à morfologia e aplicações, as denominações populares de representantes do gênero *Costus* são: cana-mansa, canarana, cana-de-macaco, pobre-velho e cana-do-brejo (Borrás, 2003; Lorenzi & Matos, 2008). *Costus spiralis* Rosc. e *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. são conhecidas por apresentarem as mesmas utilizações na medicina tradicional (Gasparri, 2005).

Na medicina popular brasileira, o chá de *C. spicatus* é utilizado com fins depurativos, adstringentes e diuréticos (Boorhem et al., 1999; Borrás, 2003). Boorhem et al. (1999) descrevem que a decocção das partes vegetativas da espécie atuam no tratamento de irritações vaginais, leucorréias e úlceras. O suco do caule fresco diluído é eficaz no tratamento de gonorréia, sífilis, nefrite, picada de insetos, problemas de bexiga e diabetes (Albuquerque, 1989; Borrás, 2003). As folhas podem ser combinadas com *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f. (cipó-tuíra) em forma de combinações (garrafadas) no tratamento da malária, hepatite e diabetes (Silva, 2004).

Experimentos realizados por Silveira et al. (2010) comprovaram a eficácia do

extrato metanólico, nas variações de níveis de glicose no sangue. O uso do chá não foi efetivo em diminuir a progressividade da *diabetes mellitus* (Keller et al., 2009) porém quando o chá foi testado em ratos a ação foi efetiva para o tratamento de *Herpes zoster* (Pinna et al., 2008). Os glicosídeos flavônicos presentes nas folhas de *C. spicatus* são indicadores de potencialidades inibidoras na produção de óxido nítrico com possíveis atividades anti-inflamatórias (Gasparri, 2005; Silva et al., 2000).

As descrições anatômicas realizadas Specht & Stevenson (2006) para as famílias Costaceae e Zingiberaceae indicam diferenças estruturais de caráter diagnóstico para ambas as famílias. No entanto, as informações ainda não são suficientes para elucidar potencialidades individuais de cada parte vegetativa. Este estudo fornece informações adicionais quanto à estrutura permitindo a compreensão dos aspectos anatômicos relacionados à taxonomia, composição química, defesa contra patógenos e fisiologia da espécie.

Este trabalho teve como objetivo identificar anatomicamente as principais estruturas dos órgãos vegetativos de *C. spicatus*, verificando principais classes de metabólitos secundários presentes nos tecidos, por meio da abordagem histoquímica e fitoquímica (prospecção) dando subsídios a estudos taxonômicos, agronômicos, fisiológicos e farmacológicos referente à família.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico foi coletado no Campus Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas. Foram selecionados e coletados 60 indivíduos adultos (10 indivíduos para estudo anatômico e 50 indivíduos para avaliação fitoquímica). A exsicata encontra-se inserida no acervo do Herbário HUAM da Universidade Federal do Amazonas – UFAM sob número de registro 8288.

Microscopia de luz

Para o estudo anatômico foram utilizados 10 indivíduos sendo retiradas cinco amostras de partes vegetativas das folhas, caules, raízes; sendo fixadas em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético glacial, álcool etílico a 70%), conservadas em álcool etílico (70%), desidratadas em séries etílicas (70 – 100%) e infiltradas em metacrilato (Historesin, Leica). Em micrótomo rotativo, os blocos foram seccionados (5 a 10 µm de espessura) e as secções foram coradas em azul de toluidina tampão citrato, pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), sendo montadas em resina sintética (Permount-Fisher).

Na preparação de lâminas semipermanentes foram utilizadas partes vegetativas seccionados transversalmente a mão livre, clarificadas com solução comercial de hipoclorito de sódio a 20%, coradas com azul de astra e fucsina e montadas em glicerina. Na dissociação da epiderme, foram retiradas secções do ápice, bordo e base das lâminas foliares sendo submetidas à solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (70-100%) durante quatro dias. Em seguida, foram lavadas em álcool etílico, posteriormente coradas com solução aquosa azul de astra e safranina 1% e montadas em glicerina (Kraus & Arduin, 1997).

A contagem dos estômatos e tricomas foi efetuada em 30 campos por folha, tomados aleatoriamente, para as duas faces da epiderme (abaxial e adaxial), utilizando-se microscópio óptico Carl Zeiss (aumento de 400x). A classificação dos tricomas foi feita com base em Theobald (1979).

Para os testes histoquímicos, secções das partes vegetativas do material fresco que não foram submetidos a reagentes foram fotografadas, a fim de documentar a coloração original dos tecidos analisados (branco). Secções controle foram realizadas simultaneamente, de acordo com a metodologia descrita nos protocolos. As classes de metabólitos investigadas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas do material.

	GRUPOS DE METABÓLITOS	COLORAÇÃO	REAGENTES/AUTORES
Lipídeos	Lipídeos totais	vermelha	Sudan IV (Gerlach, 1984)
Compostos Fenólicos	Compostos fenólicos gerais	verde, púrpura, azul, negro	Cloreto Férrico III (Johansen, 1940)
	Taninos	vermelha	Vanilina Clorídrica (Mace e Howell, 1974)
	Lignina	vermelha	Floroglucinol (Johansen, 1940)
Alcaloides	Alcaloides	castanho-avermelhado	Reagente de Drangendorff (Costa, 1982);
Polissacarídeos Neutros	Amido	Roxa	Lugol (Jensen, 1962)
	Pectinas e mucilagens	azul turqueza	Azul de Metileno (Salatino & Silva, 1975)
Proteínas	Proteínas Estruturais	laranja	Xilidine Ponceau (O'Brien & McCully, 1981)
Terpenóides	Óleos essenciais e óleo-resinas	azul (essência), vermelha (resina), violeta (essência+resina)	Reagente de Nadi (David e Carde, 1964)
Cristais	Cristal de oxalato de cálcio	transparente	solução de ácido clorídrico 10 % (Jensen, 1962)

Eletromicrografia de varredura (MEV)

Para a obtenção das eletromicrografias de varredura, secções fixadas em FAA 70% por 48 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% foram desidratadas em série etílica crescente de acordo com Johansen (1940), processadas em secador de ponto crítico de CO₂, aderidas em suportes metálicos através de fita de carbono dupla face e metalizadas com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura por 150 segundos em corrente de 25 mA. A observação e a obtenção de imagens foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém), em microscópio eletrônico de varredura LEO modelo 1450 VP, com aceleração de voltagem de 15 kV, sendo as escalas micrométricas projetadas nas mesmas condições ópticas.

Fitoquímica

A triagem fitoquímica das partes vegetativas de *C. spicatus* foi realizada segundo a metodologia de Matos (1988). Para avaliação do extrato aquoso, 40g de material vegetal moído foi pesado, procedeu-se a extração com água e, em seguida foi levado ao banho-maria por 1 hora a 70°C. Posteriormente foi filtrado, sendo o volume completado para 200 mL com o líquido extrator. O extrato aquoso foi submetido a testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogénéticos, taninos, amido, grupos de ácidos fixos e ácidos voláteis.

Para a preparação do extrato alcoólico procedeu-se com a pesagem das serragens diluídas em etanol (PA), sendo submetidas ao processo de

maceração à frio em seguida filtrada. As soluções foram levadas ao rotaevaporador, sendo posteriormente congeladas e liofilizadas. Os extratos etanólicos proporcionaram reações químicas de caracterização (precipitação e coloração) de flavonóides, taninos, alcaloides, antraquinonas, saponinas, heterosídeos quando submetidas a reagentes específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Descrição Morfológica

Costus spicatus apresenta folhas elípticas dispostas em espiral no caule, com inflorescência em espigas estrobiliformes de brácteas vermelhas e flores amarelas (Figuras 1 e 2).

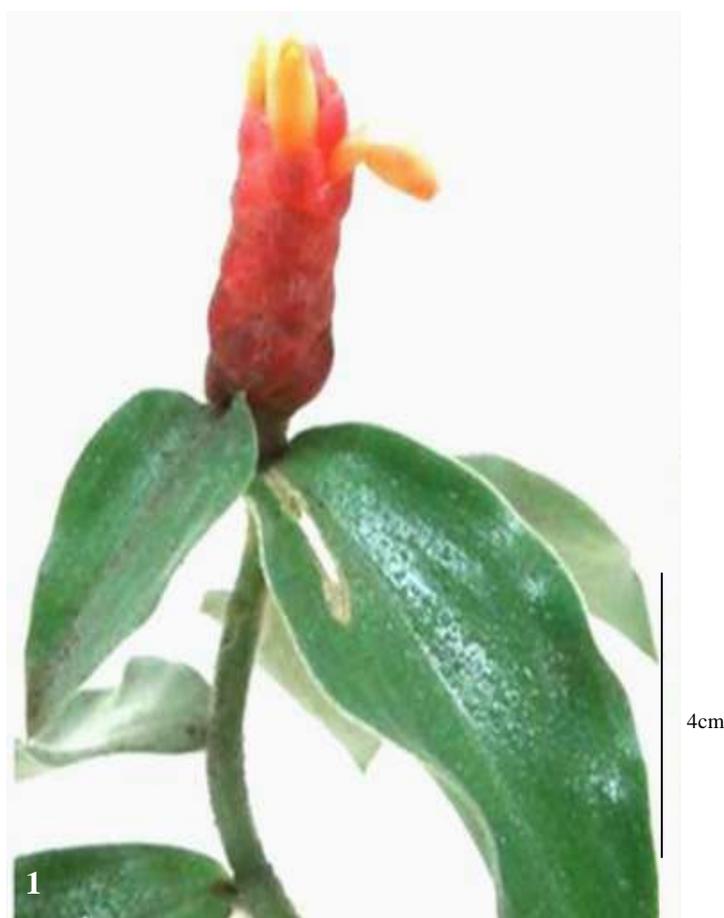


Figura 1. Inflorescência de *Costus spicatus* (Jacq.)

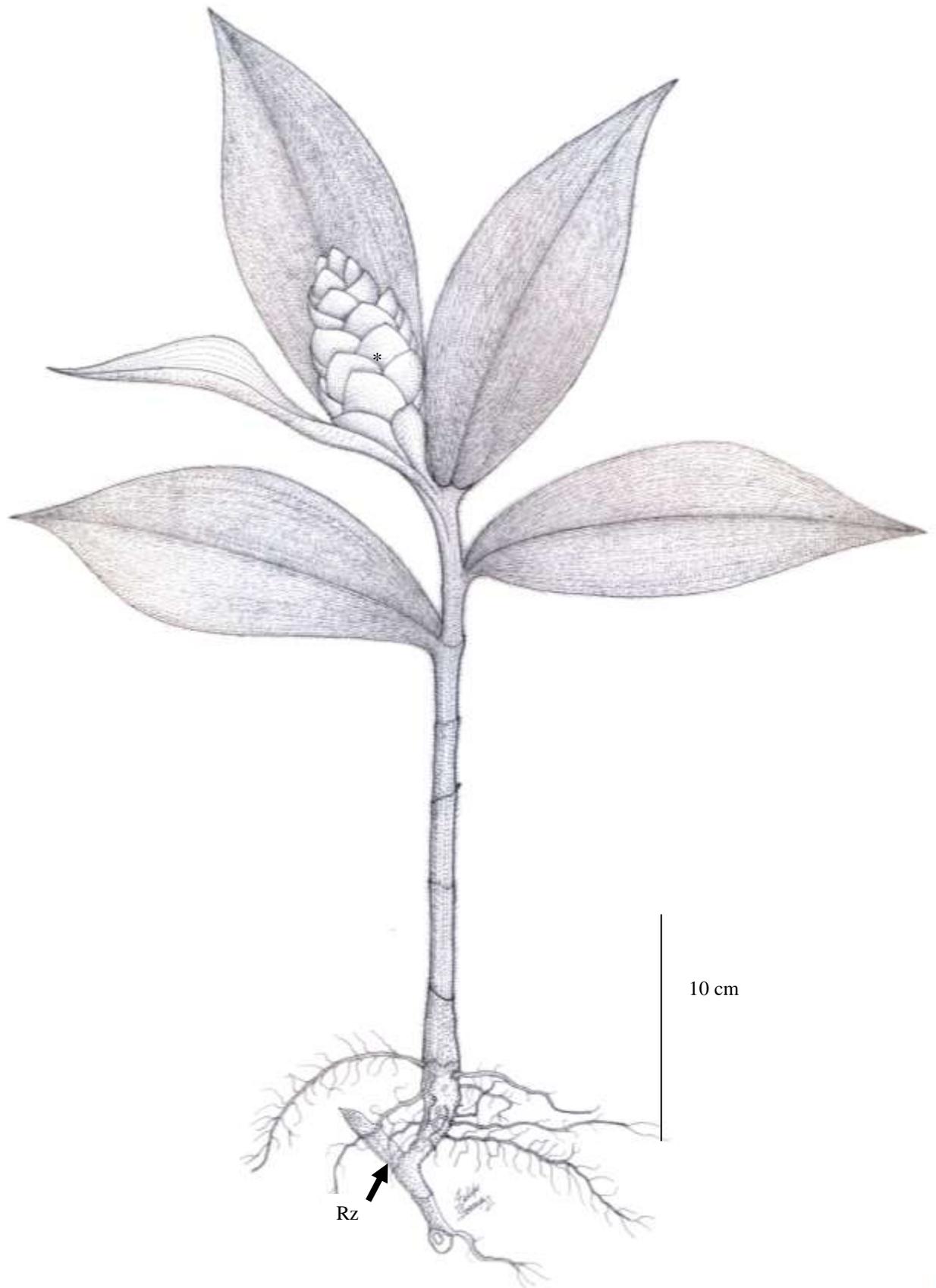


Figura 2. Ilustração dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.

Folha

A epiderme foliar em vista frontal apresenta células com paredes retas levemente onduladas com formato hexagonal (Figura 3). Os tricomas são do tipo tectores filamentosos simples, sem ramificações (Figura 4), ocorrendo numa média de 13,47 mm² na face adaxial e 43,83 mm² na face abaxial. De acordo com Tomlinson (1956; 1962) a morfologia dos tricomas, unisseriados, não ramificados, trata-se de uma característica distintiva entre Costaceae e Zingiberaceae.

O complexo estomático é formado por um par de células guardas, um par de células subsidiárias paralelas, e nas extremidades, duas outras células subsidiárias perpendiculares, constituindo estômatos tetracíticos (Figura 3). Este padrão de arranjo estomático também foi descrito em *Costus spirales* por Oliveira et al. (1986) e em *Costus spicatus* (Paes et al., 2009). A folha é anfi-hipoestomática com média de estômatos de 37,9 est.mm² na face adaxial e de 50,17 est.mm² na face abaxial.

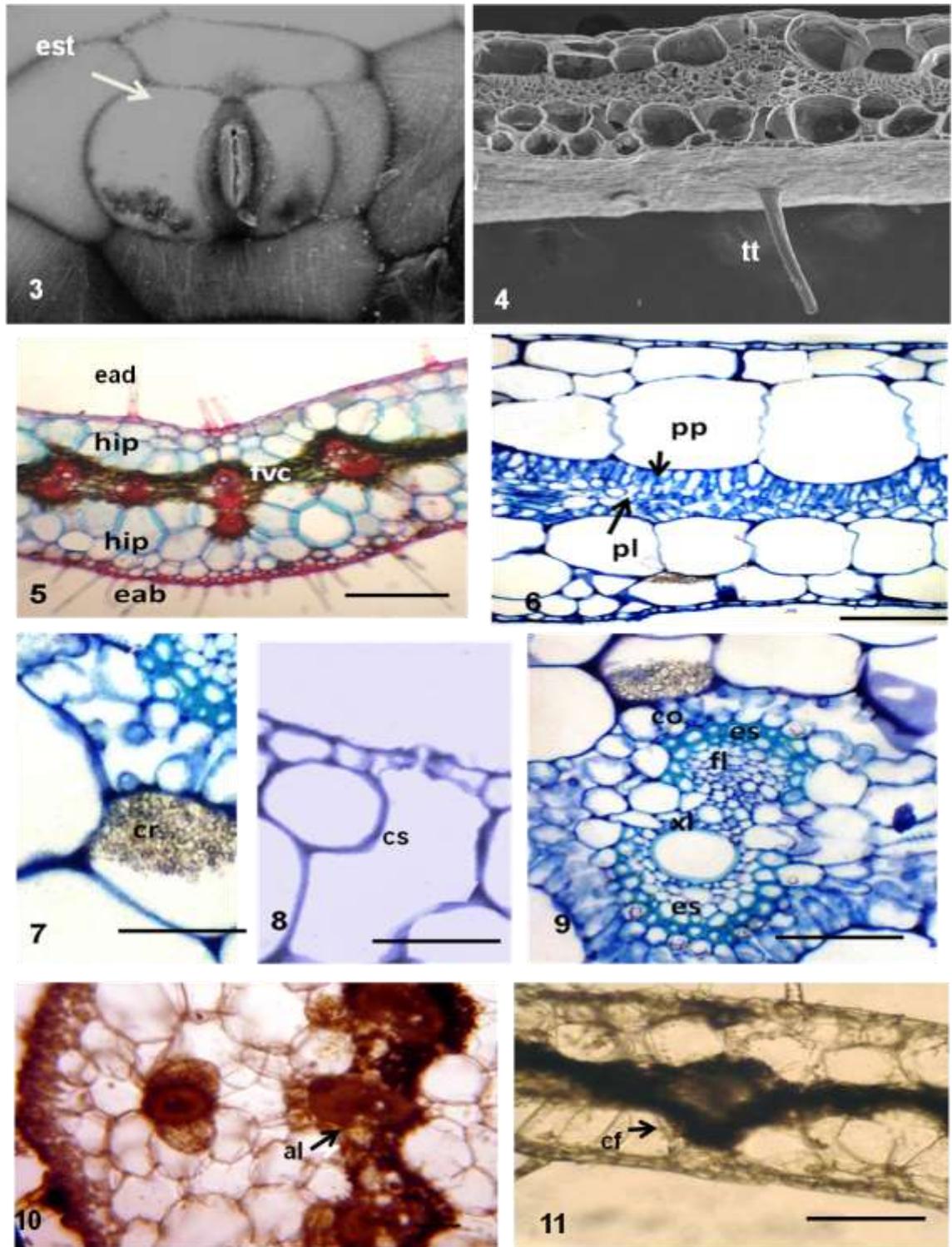
Secções transversais da folha evidenciam epiderme uniestratificada, revestida por cutícula em ambas as faces sendo mais espessa na abaxial. Sob a epiderme há presença de hipoderme em ambas as faces sendo constituída de duas camadas de células arredondadas com paredes delgadas (Figuras 5 e 6).

As células da hipoderme são ricas em cristais de oxalato de cálcio (Figuras 7 e 9), corroborando os registros de Oliveira et al. (1986) para *C. spiralis*. Os cristais, geralmente, encontram-se distribuídos entre todos os níveis taxonômicos dos organismos fotossintéticos. O acúmulo de cristais nos vegetais, possivelmente, apresenta um aumento na capacidade de regulação do cálcio (Ca) e atua na proteção contra herbivoria (Franceschi & Nakata, 2005). As células subepidérmicas de *C.spicatus* freqüentemente são interrompidas pelas câmaras subestomáticas (Figura 8). Na região da nervura mediana este tecido pode sofrer variações quanto

ao número de células, em virtude do seu formato côncavo-convexo (Figura 5). Specht & Stevenson (2006) afirmaram que a variação no número de células da hipoderme tem um caráter distintivo para Costaceae, pois na família Zingiberaceae, este tecido se apresenta ausente ou possui apenas uma camada simples.

O mesofilo apresenta organização dorsiventral com parênquima paliçádico constituído de uma a duas camadas de células alongadas e justapostas. Nesta região, é observada grande quantidade de cristais e ausência de meatos, resultando no aspecto denso. O parênquima lacunoso é constituído por cerca de duas a três camadas de células isodiamétricas (Figura 6, 7 e 11).

Os feixes vasculares são bicolaterais, envolvidos por calotas de fibras esclerenquimáticas, dispostas externamente ao xilema e ao floema (Figura 9). Os testes histoquímicos indicaram a presença de alcaloides e compostos fenólicos em células que compõem o mesofilo (Figura 10 e 11), respectivamente.



Figuras 3 -11. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 3. Epiderme em vista frontal, estômatos (est) em (MEV). 4. Corte transversal da lâmina foliar com tricomas tectores (MEV). 5-11. Secções transversais da lâmina foliar de *Costus spicatus*. 5. Nervura mediana com feixe vascular central (fvc) e hipoderme (hip). Epiderme adaxial (ead). Epiderme abaxial (eab). 6. Mesofilo; parênquima paliçádico (pp) e lacunoso (pl). 7. Cristais de oxalato de cálcio (cr). 8. Câmara subestomática (cs). 9. Feixe vascular central: xilema (xl), floema (fl) e calotas de fibras de esclerênquima (es), colênquima (co). 10. Alcalóides em regiões próximo aos feixes vasculares. 11. Compostos fenólicos na região do mesofilo. Barras= 170 μ m (3 e 4), 100 μ m (6, 7, 8, 10,11), 5 μ m (5), 200 μ m (9).

Caule

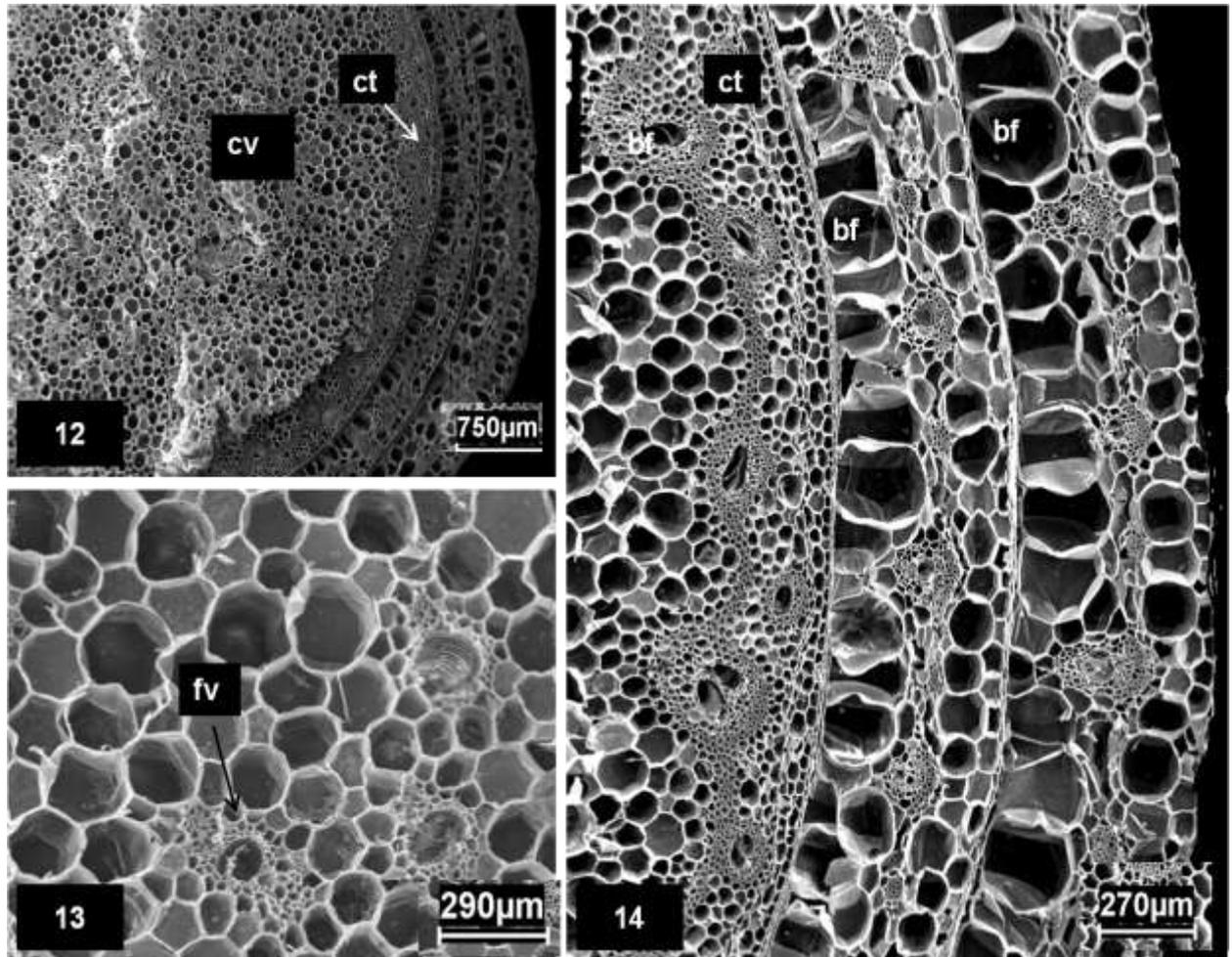
O caule aéreo em corte transversal possui uma haste central envolvida por duas a três bainhas foliares. Cada bainha apresenta a mesma estrutura da lâmina foliar (Figura 12 e 14).

Sob as bainhas foliares, a haste caulinar apresenta uma epiderme uniestratificada com células ligeiramente retangulares revestidas por cutícula delgada (Figuras 14 e 15). O córtex é constituído por um parênquima clorofiliano formado por duas a quatro camadas de células. A endoderme é distinta, delimitando a região cortical, evidenciada pelas estrias de Caspary (Figura 15 e 16). Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2006) afirmam que o córtex e a medula são muitas vezes contínuos em monocotiledôneas, mas sugerem que pode haver uma delimitação interna pela presença de camada endodérmica ou ocorrência de feixes vasculares.

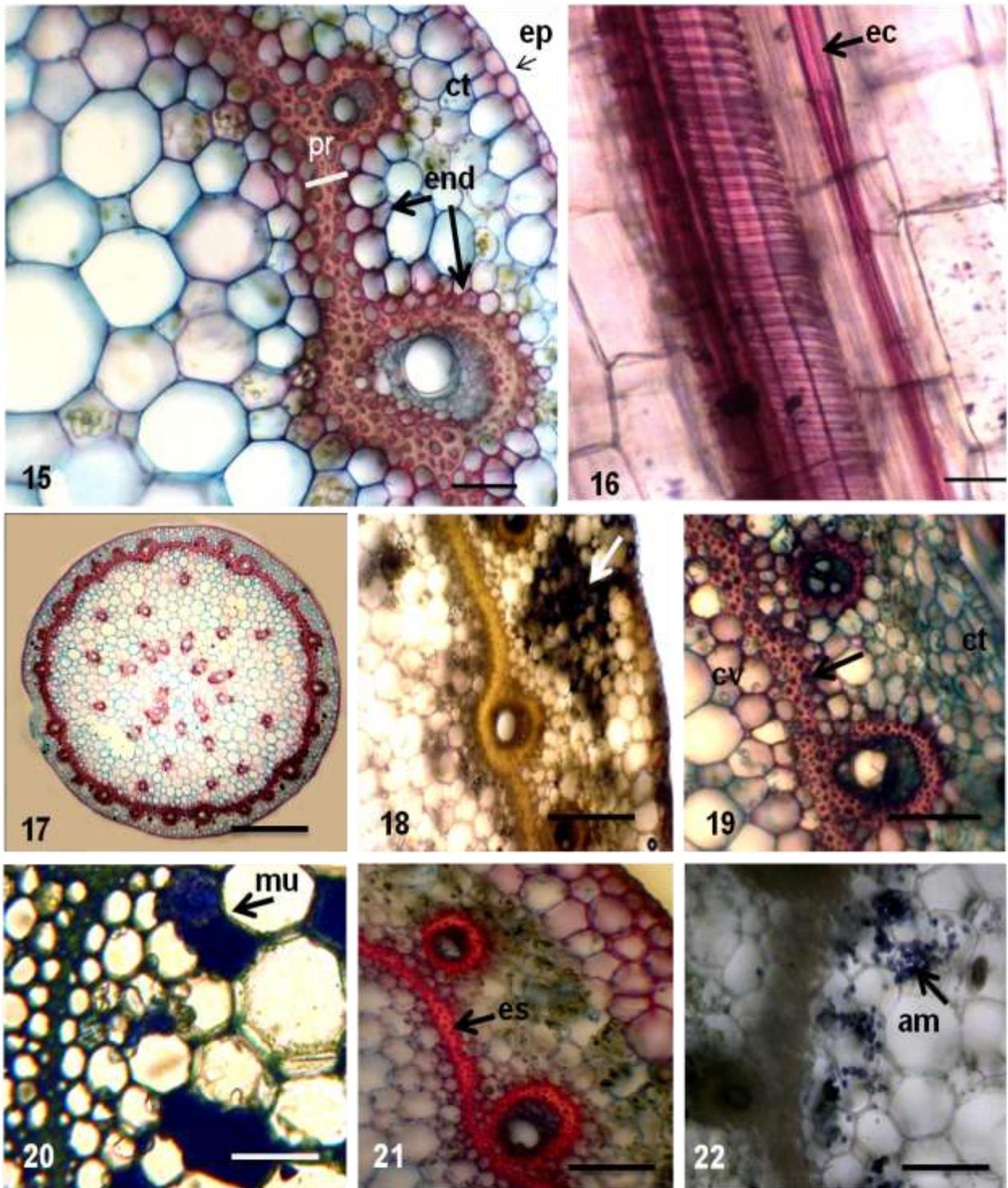
O periciclo é composto por duas a três fileiras de células, com paredes espessadas e lignificadas coradas de rosa pelo floroglucinol (Figura 21), de tamanho reduzido que envolve os tecidos vasculares (Figura 15). Menezes et al. (2005) afirmaram que o periciclo aparece sempre adjacente ao córtex, onde endoderme e periciclo constituem o meristema de espessamento primário. Para Silva (2009), ambos os tecidos são responsáveis pelo espessamento do corpo primário das monocotiledôneas.

O tecido vascular é colateral com distribuição de feixes na região medular, determinando a classificação do tipo atactostélica (Figura 17). As reações histoquímicas indicam que nas células parenquimáticas que compõem o tecido do córtex, há reservas de compostos fenólicos (Figura 18), alcaloides (Figura 19) e nas

células que compõem o cilindro vascular as reservas são de mucilagem (Figura 20) e de amido (Figura 22).



Figuras 12-14. Eletromicrografia de varredura de seções transversais do caule de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 12. Cilindro vascular (cv) e córtex (ct). 13. Feixes vasculares na região medular (fv) 14. Detalhe das bainhas foliares (bf).



Figuras 15-22. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. 15. Seções transversais da haste: córtex (ct): epiderme (ep), endoderme (end), periciclo (pr). 16. Seção longitudinal da haste evidenciando estrias de Caspary (ec) na endoderme. 17-22. Seções transversais da haste: 17. Visão geral da haste 18. Compostos fenólicos em células da região cortical. 19. Células do córtex e cilindro vascular (cv) contendo alcalóides. 20. Células do cilindro vascular contendo mucilagem (mu). 21. Bainha pericíclica lignificada (es). 22. Parênquima medular com amido (am). Barras= 5 μ m (17), 100 μ m (15, 18, 19, 20, 21, 22), 200 μ m (16).

Rizoma

O rizoma (caule subterrâneo) é revestido por uma epiderme uniestratificada suberizada (Figura 23). A região cortical é formada por células parenquimáticas que apresentam formato isodiamétrico. A região medular é delimitada pelas estrias de Caspary que se dispõem lateralmente aos feixes vasculares (Figura 24). As células parenquimáticas que constituem a região central do cilindro vascular têm formato arredondado com variações no tamanho, sendo portadoras de inúmeros grãos de amido (Figura 25 e 26). Segundo Tomlinson (1956) tanto em Costaceae como Zingiberaceae a presença amido é intensa neste órgão.

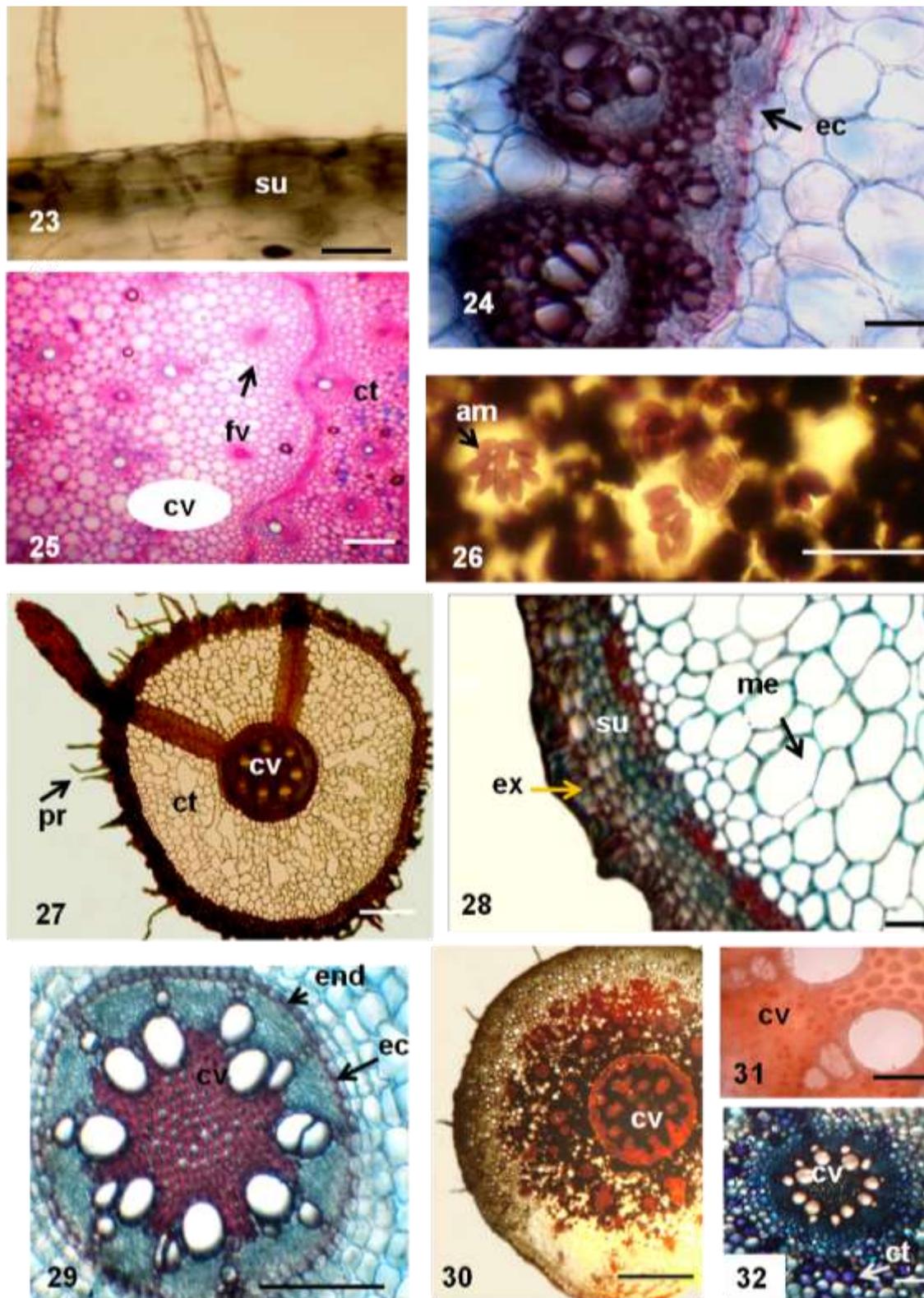
Raiz

A raiz de *C. spicatus*, evidencia epiderme uniestratificada constituída por células de formato poligonal, revestida por pelos radiculares (Figura 27). Adjacente, está localizada a exoderme composta de uma única camada de células, em seguida ocorrem 3 a 6 camadas de células, com paredes espessadas e suberificadas constituindo o súber estratificado (Figura 28).

Na região cortical, há espaços intercelulares que variam na forma e tamanho (Figura 28). Segundo Oliveira et al. (1986) estes espaços constituem meatos que resultam em grandes câmaras internas. A endoderme é unisseriada com as estrias de Caspary evidentes, apresentando deposição de lignina num arranjo em formato de "U". O periciclo consiste em uma camada unisseriada de células com paredes delgadas de formato retangular, situado internamente à endoderme, responsáveis pela formação das raízes laterais (Figura 27 e 29).

O tecido vascular está organizado na forma de um arco com cerca de 10 pólos de protoxilema classificada como poliarca. Os cordões de floema alternam-se

com o xilema. A medula é formada por parênquima com células de paredes espessadas e lignificadas coradas de rosa com fluroglucinol (Figura 29). As células parenquimáticas do córtex e da medula reagiram aos testes histoquímicos evidenciando a presença de amido (Figura 30), proteína estrutural (Figura 31) e mucilagem (Figura 32).



Figuras 23-32. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. **23-25.** Secções transversais do rizoma. **23.** Epiderme rizoma (branco), súber (su). **24.** Endoderme e Estrias de Caspary (ec). **25.** Feixes vasculares (fv). **26.** Idioblastos amilíferos (am). **27-32.** Secções transversais da raiz. **27.** Visão geral da raiz: pêlos radiculares (pr), córtex (ct), cilindro vascular (cv). **28.** Detalhe da exoderme (ex), meatos (me), súber (su). **29.** Cilindro vascular (cv): endoderme (end), Estrias de Caspary (ec). **30.** Distribuição de amido nas células cilindro vascular e córtex. **31.** Proteínas estruturais no cilindro vascular. **32.** Células do cilindro vascular (cv) e do córtex coradas em azul intenso indicando mucilagem. Barras = 100 μ m (23, 24, 25, 27, 28, 29). 200 μ m (31), 5 μ m (26, 30, 32).

Prospecção fitoquímica

O extrato aquoso e etanólico dos órgãos vegetativos de *C. spicatus* apresentaram diferentes classes de substâncias, tais como polifenóis, saponinas e heterosídeos em todos os órgãos vegetativos da espécie (Tabela 2), resultados estes também observado por Pinna et al. (2008).

Tabela 2. Compostos secundários encontrado no extrato etanólico e aquoso de orgãos de subterrâneos (raiz+rizoma) e aéreos (caule e folhas) de *C. spicatus* (Jacq.) Sw.

Classes de Substâncias	Extrato Aquoso			Extrato Etanólico		
	raiz	caule	folha	raiz	caule	folha
Fenóis	NR	NR	NR	+	+	+
Taninos	-	+	+	-	-	+
Antocianinas e Antocianidinas	NR	NR	NR	-	-	-
Chalcona e aurona*	NR	NR	NR	-	-	-
Flavonas*	NR	NR	NR	+	+	-
Leucoantocianidina*	NR	NR	NR	+	+	+
Catequina*	NR	NR	NR	-	-	+
Flavonas, flavonóis e xantonas*	NR	NR	NR	-	+	+
Saponina	NR	NR	NR	+	+	+
Alcaloides	NR	NR	NR	-	+	+
Heterosídeos saponínicos	+	+	+	NR	NR	NR
Heterosídeos cianogênicos	+	+	+	NR	NR	NR
Ácidos voláteis	+	+	+	NR	NR	NR
Heterosídeos antociânicos*	-	-	-	NR	NR	NR

(+) = presença de substância (-) = ausência de substância. NR: não realizados. *flavonóides.

De uma forma geral, as substâncias evidenciadas no extrato etanólico e aquoso são pertencentes aos polifenóis representados pelos fenóis, taninos, flavonóides (flavonas, xantonas, auronas etc.). Segundo Kaufman et al. (1998), estas substâncias constituem um importante papel ecológico como estratégias de

defesa contra herbivoria e como estratégias reprodutivas das plantas. Os flavonóides presentes em *C. spicatus* (Tabela 2), também foram observados em folhas de 81 espécies da Ordem Zingiberales por Willians & Harborne (1977) e glicosídeos flavônicos isolados de folhas de *C. spicatus* por Silva et al. (2000).

Heterosídeos cianogênicos foram detectados no extrato aquoso de todas as partes vegetativas de *C. spicatus*. De acordo com Gleason (2011), a presença de tais substâncias é um indicativo que há liberação de ácido cianogênico, sendo produzidas por vários tecidos de plantas, porém mais frequentes em sementes. Para Kaufman et al. (1998) são compostos utilizados como defesa química.

Segundo Verpoorte & Memelink (2002), o produto do metabolismo secundário desempenha múltiplas funções no ciclo de vida da planta com múltiplas ações, sendo classificadas como mediadoras nas interações planta e inseto, planta e micro-organismo e nas interações planta e planta (Dixon, 2001).

Os resultados obtidos neste estudo possibilitam a compreensão dos arranjos celulares e suas reservas, fornecendo à distribuição das principais classes de substâncias nas partes vegetativas de *C. spicatus* constituindo direcionamento a estudos químicos, agronômicos e fisiológicos.

As substâncias evidenciadas indicam possíveis aplicações no controle biológico e corroboram as informações já relatadas pelo conhecimento tradicional quanto às potencialidades da espécie.

Os resultados ampliam o conhecimento sobre a família Costaceae, fornecendo subsídios a estudos taxonômicos e podem auxiliar no entendimento das relações entre as famílias da Ordem Zingiberales.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), ao Laboratório de Botânica Agroflorestal (LABAF/UFAM); à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM), ao Museu Paraense Emílio Goeldi e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical/UFAM.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J.N. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 100p.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP – (APG III). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, p.105-121. 2009.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438p.
- BOORHEM, R.L. et al. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil Ltda, 1999. 416p.
- BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 2003. 322p.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. 1117p.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et 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.
- DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843-847, 2001.
- FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review Plant Biology**, v.56, p.41-71, 2005.
- GASPARRI, S. **Estudo da atividade antioxidante mutagênica/antimutagênica induzida pelo extrato vegetal de *Costus***. 2005. 78p. Dissertação (Mestrado – Área

de concentração em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas.

GERLACH, D. **Plant histochemistry and citochemistry**. New York: Academic Press, 1984. 301p.

GLEASON, F.K. **Plant Biochemisty**. University of Minnesota. Jone & Bartlet press, 2011. 248p.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: H.H. Freeman and Company, 1962. 480p.

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

KAUFMAN P.B.; CSEKE, L.J.; DUKE, J.A. BRIELMANN, H.L. **Natural products from plants**. London New York: CRC Press.,1998. 632p.

KELLER, A.C. et al. *Costus spicatus* tea failed to improve diabetic progression in C57BLKS/J db/db mice, a model of type 2 *diabetes mellitus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, n.2, p.248–254, 2009.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 198p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MAAS, P.J.M. Costoideae (Zingiberaceae). **Flora Neotropica Monograph** v.8, p.1-140, 1972.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v.64, p.1297-1302, 1974.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 126p.

MENEZES, N.L. et al. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons considerations on the "PTM". **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, n.2, p.259-274, 2005.

O'BRIEN, T.P. & MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltda,1981. 316p.

OLIVEIRA, F. et al. Caracterização morfológica de cana-do-brejo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.186, n.2, p.123-135, 1986.

PAES, L.S. et al. Estudo das estrutura foliar de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (pobrevelho) numa perspectiva anatômica e fitoquímica. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA 4., 2009, Belém. Anais do Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CD-ROM). Belém: IFPA, 2009.

PETERSEN, O. G. *Costus spicatus* (Zingiberaceae). **Flora Brasiliensis**, v.3, n.3, p.52, 1890.

PINNA, F.L. et al. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade cicatrizante do spray a base de *Costus spicatus* Jacq. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, São Paulo. **Painéis**, São Paulo: Adaltech, 2008.

SALATINO, A.; SILVA, J.B. Anatomia e óleos essenciais de folhas de *Piper regnella* (Miq) C. DC. var. *regnella*. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v.3, n.1, p.95-106, 1975.

SILVA, B.P. et al. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.53, n.1, p.87-92, 2000.

SILVA, C.G. DA. **O espessamento primário no sistema caulinar e a continuidade entre estes tecidos nos órgãos vegetativos de Zingiberaceae e Costaceae:**

enfoque nos tecidos da endoderme e periciclo. 2009. 212p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Anatomia de plantas vasculares) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, L.N. **Aspectos anatômicos e etnofarmacológicos de *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f. (Convolvulaceae).** 2004.100p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Botânica) – Departamento de Botânica, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

SILVEIRA, G.O. et al. Lack of antidiabetic activity of the methanol extract of *Costus spicatus* in rats. **Scientia Plena**, v.6, n.12, p.1-6, 2010.

SPECHT, C.D. et al. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 3, p.33-345, 2001.

SPECHT, C.D; STEVENSON, W. A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales). **Taxon**, v.55, n.1, p.153-163, 2006.

THEOBALD, W.L.; KRAHULIK, J.L.; ROLLINS, R.C. Trichome description and classification. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** v.1. Oxford: Clarendon Press, 1979. p.40-53.

TOMLINSON, P.B. Phylogeny of the scitamineae morphological and anatomical consideration. **Evolution**, v.16, n.2, p.192-213, 1962.

TOMLINSON, P.B. Studies in the systematic anatomy of the Zingiberaceae. **Journal of the Linnean Society**, v.55, n.1, p.547-592, 1956.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.181-187, 2002.

WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B. The leaf flavonoids of the Zingiberales. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.5, p.221-229, 1977.

**CAPÍTULO II: Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de
órgãos vegetativos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl
(Verbenaceae)**

Artigo para submissão à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

**Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de
Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl (Verbenaceae)**

RESUMO: *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl é uma planta de ocorrência natural na região amazônica com aplicações na medicina popular para tratamento de doenças como malária, diabetes, gripe e inflamações de forma geral. O objetivo deste trabalho foi identificar aspectos estruturais das partes vegetativas (folha, caule, raiz) associados à triagem fitoquímica, visando ampliar as informações referentes à espécie e contribuir para estudo taxonômico, agrônômico, fisiológico e farmacológico. As análises anatômicas por meio da microscopia óptica e de varredura evidenciaram folhas anfi-hipoestomáticas com estômatos diacíticos e anomocíticos. Na superfície foliar estão presentes tricomas (glandulares e tectores). O mesofilo é dorsiventral. O caule apresenta tecido vascular formando um cilindro completo e as raízes são do tipo protostélico. Os testes histoquímicos indicaram a presença de proteínas estruturais, terpenóides, alcaloides, mucilagens, principalmente no caule. A prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e aquoso revelou a presença de saponinas, taninos, alcaloides, compostos fenólicos e heterosídeos cianogênicos.

Palavras-chave: glicosídeos, flavonóides, anatomia, gervão

ABSTRACT: Structural, histochemical, phytochemicals aspects of the vegetative organs of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae).

Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl is a naturally occurring plant in the Amazon region with applications in folk medicine to treat diseases such as malaria, diabetes, flu and inflammation in general. The objective of this study was to identify structural features of the vegetative parts (leaf, stem, root) associated with the phytochemical screening aimed at increasing the information about the species in order to contribute to taxonomic studies, agronomic, physiological and pharmacological. The anatomical analysis by optical microscopy and scanning showed amphihypostomatic leaf with diacytic stomata and anomocytic. Trichomes glandular and tector are present on the leaf surface and extrafloral nectaries. The mesophyll is dorsiventral. The stem presents vascular tissue forming a complete cylinder and the roots are of type protostélico. The histochemical tests indicated the presence of structural proteins, terpenoids, alkaloids, mucilage, mainly in the stem. A phytochemical survey of aqueous and ethanol extracts revealed the presence of saponins, tannins, alkaloids and flavonoids, cyanogenic heterosides.

Keywords: glycosides, flavonoids, anatomy, gervão

INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae é composta por árvores, arbustos e ervas com aproximadamente 35 gêneros e 1150 espécies (Mabberley, 2008). Apresenta distribuição pantropical, ocorrendo principalmente nos neotrópicos (Santos et al., 2009). São consideradas aromáticas com espécies empregadas na medicina popular (Souza & Lorenzi, 2008).

Entre as verbenáceas, *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl com ocorrência natural na América Tropical, Austrália, Havaí e Índia (Borrás, 2003; Lorenzi & Matos, 2008) destaca-se por suas aplicações terapêuticas. É uma planta típica de áreas secas (Dias-Filho et al., 1995) sendo consideradas “planta daninha” quando ocorrentes em locais não desejados (Lorenzi & Matos, 2008). De acordo com Caribé & Campos (1991), trata-se de uma infestante de pastagens e áreas de cultivo.

No Brasil, é denominada com vários nomes populares tais como: gervão-azul, rinchão, gervão, gervão-roxo, gervão- do-campo, gervão- legítimo, falsa-verbena, erva-gervão, aguarapondá, mocotó, verbena-falsa, chá-do-brasil, ervão, orgibão, uregão, verbena (Lorenzi & Matos, 2008; Borrás, 2003).

As aplicações de uso popular indicam ações antidiarréicas, hepatopatias, nevralgia, antihemorrágicas, aperiente, ciática, antirreumático, úlceras e dores de dentes (Salgueiro, 2004) antiúlceras e anti-inflamatórias (Jesus, 2009), malária, febre e gripe (Alves et al., 2008).

Os registros científicos indicam inúmeras propriedades, dentre elas: potencial inibitório da secreção de ácido gástrico no piloro de ratos com uso de extrato aquoso (Mesia-Vela et al., 2004), a atividade antimalárica do extrato etanólico contra *Plasmodium berghei* (Okokon et al., 2008), a atividade anti-inflamatória e

antiulcerogênica (Penido et al., 2006), a ação antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (Silveira et al., 2007), a atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico (Moreira et al., 2007), potencial no tratamento de hipercolesterol e obesidade atuando na redução de riscos de acidentes vasculares (Ikewuchi et al., 2008), atividade antioxidante do ácido betunílico e do extrato verbascosídeo das raízes (Souza et al., 2010).

Apesar da ampla utilização da espécie para fins fitoterapêuticos, poucos são os estudos voltados para seus aspectos estruturais. Considerando a anatomia como um dos parâmetros essenciais para a compreensão dos mecanismos fisiológicos de uma espécie, realizou-se a identificação de estruturas anatômicas associadas à histoquímica e a prospecção fitoquímica de *S. cayennensis*, a fim de contribuir com informações quanto à produção e acúmulo de substâncias que possam ser utilizadas com fins agrônômicos, fisiológicos e farmacológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico foi coletado no Campus Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas. Foram selecionados e coletados 60 indivíduos adultos (10 indivíduos para estudo anatômico e 50 indivíduos para avaliação fitoquímica), localizados em área floresta, especificamente as margens do fragmento vegetal. A exsicata encontra-se inserida no acervo do Herbário HUAM da Universidade Federal do Amazonas – UFAM sob número de registro 8287.

Microscopia de luz

Para o estudo anatômico foram utilizados 10 indivíduos sendo retirados cinco amostras de partes vegetativas (folhas, caules, raízes) sendo fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético glacial, álcool etílico a 70%), conservadas em álcool etílico (70%), desidratadas em série etílica (70-100%) e infiltradas em metacrilato (Historesin, Leica). Em micrótomo rotativo os blocos foram seccionados (5 a 10 µm de espessura) e as secções foram coradas em azul de toluidina tampão citrato, pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), sendo montadas em resina sintética (Permount-Fisher).

Na preparação de lâminas semipermanentes foram utilizadas partes vegetativas seccionadas transversalmente a mão livre, clarificadas com solução comercial de hipoclorito de sódio a 20%, coradas com azul de astra e fuccina e montadas em glicerina. Na dissociação da epiderme, foram retiradas secções do ápice, bordo e base da lâmina foliar e submetidas à solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (70-100%) durante quatro dias. Em seguida, foram lavadas em álcool etílico, posteriormente coradas com solução aquosa azul de astra e safranina 1%, e montadas em glicerina (Kraus & Arduin, 1997). A contagem dos

estômatos e tricomas foi efetuada em 30 campos por folha, tomados aleatoriamente, para as duas faces da epiderme (abaxial e adaxial), utilizando-se microscópio óptico Carl Zeiss (aumento de 400x). A classificação dos tricomas foi feita com base em Theobald (1979). As imagens foram obtidas com auxílio do microscópio óptico Axioskop com câmara MC 80.

Para os testes histoquímicos, secções das partes vegetativas do material fresco que não foram submetidos a reagentes foram fotografados a fim de documentar a coloração original dos tecidos analisados (branco). Secções controle foram realizadas simultaneamente, de acordo com a metodologia descrita nos protocolos. As classes de metabólitos investigadas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas de órgãos vegetativos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

	Metabólitos Secundários	Cor	Reagentes/autores
Lipídeos	Lipídeos totais	vermelha	Sudan IV (Gerlach, 1984)
Compostos Fenólicos	Compostos fenólicos gerais	verde, púrpura, azul, negro	Cloreto Férrico III (Johansen, 1940)
	Taninos	vermelha	Vanilina Clorídrica (Mace & Howell, 1974)
	Lignina	vermelha	Floroglucinol (Johansen, 1940)
Alcaloides	Alcaloides	castanho-avermelhado	Wagner Furr & Mahlberg, 1981
	Amido	roxa	Lugol (Jensen, 1962)
	Mucilagens	azul turqueza	Azul de Metileno (Salatino & Silva, 1975)
Polissacarídeos	Polissacarídeos gerais	azul	Ácido periódico/reagente de Schiff – PAS (Mcmanus 1948)
	Açúcares redutores (glucose, fructose)	verde (monossacarídeos) vermelho (dissacarídeos)	Reagente de Fehling (Sass, 1951)
Proteínas	Proteínas Estruturais	laranja	Xilidine Ponceau (O'Brien & McCully, 1981)
Terpenóides	Óleos essenciais e óleo-resinas	azul (essência), vermelha (resina), violeta (essência+resina)	Reagente de Nadi (David & Carde, 1964)
	Grupo carbonila	vermelho alaranjado	2-4-dinitrofenilhidrazina (Ganter & Jollès, 1969)

Eletromicrografia de varredura (MEV)

Para a obtenção das eletromicrografias de varredura, secções fixadas em FAA 70% por 48 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% foram desidratadas em série etílica crescente de acordo com Johansen (1940), processadas em secador de ponto crítico de CO₂, aderidas em suportes metálicos através de fita de carbono dupla face e metalizadas com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura por 150 segundos em corrente de 25 mA. A observação e a captação de imagens foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Museu Paraense Emílio

Goeldi (Belém - PA), em microscópio eletrônico de varredura LEO modelo 1450 VP, com aceleração de voltagem de 15 KV, sendo as escalas micrométricas projetadas nas mesmas condições ópticas.

Fitoquímica

Para a triagem fitoquímica foram utilizados 50 indivíduos de *S. cayennensis*, sendo processadas partes vegetativas (folhas, caules e raízes) segundo a metodologia de Matos (1988). Para avaliação do extrato aquoso, 40g do material vegetal moído foi pesado, depois realizou-se a extração aquosa. Em seguida, a solução foi levada ao banho-maria por 1 hora a 70°C, posteriormente filtrada e o volume completado para 200 mL com o líquido extrator. O extrato aquoso foi submetido a testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amido, grupos de ácidos fixos e ácidos voláteis.

Para a preparação do extrato alcoólico procedeu-se com a pesagem das serragens diluídas em solução etanol, sendo submetidas ao processo de maceração a frio em seguida filtrada. As soluções foram levadas ao rota-evaporador, sendo posteriormente congeladas e liofilizadas. Os extratos etanólicos proporcionaram reações químicas de caracterização (precipitação e coloração) de flavonóides, taninos, alcaloides, antraquinonas, saponinas e heterosídeos quando submetidas a reagentes específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl é um subarbusto bastante ramificado com 70 a 100 cm de altura, as folhas são simples com ápice agudo, base decurrente e bordo denteado, e as inflorescências são terminais em forma de espiga (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Visão geral de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, destacando a inflorescência.

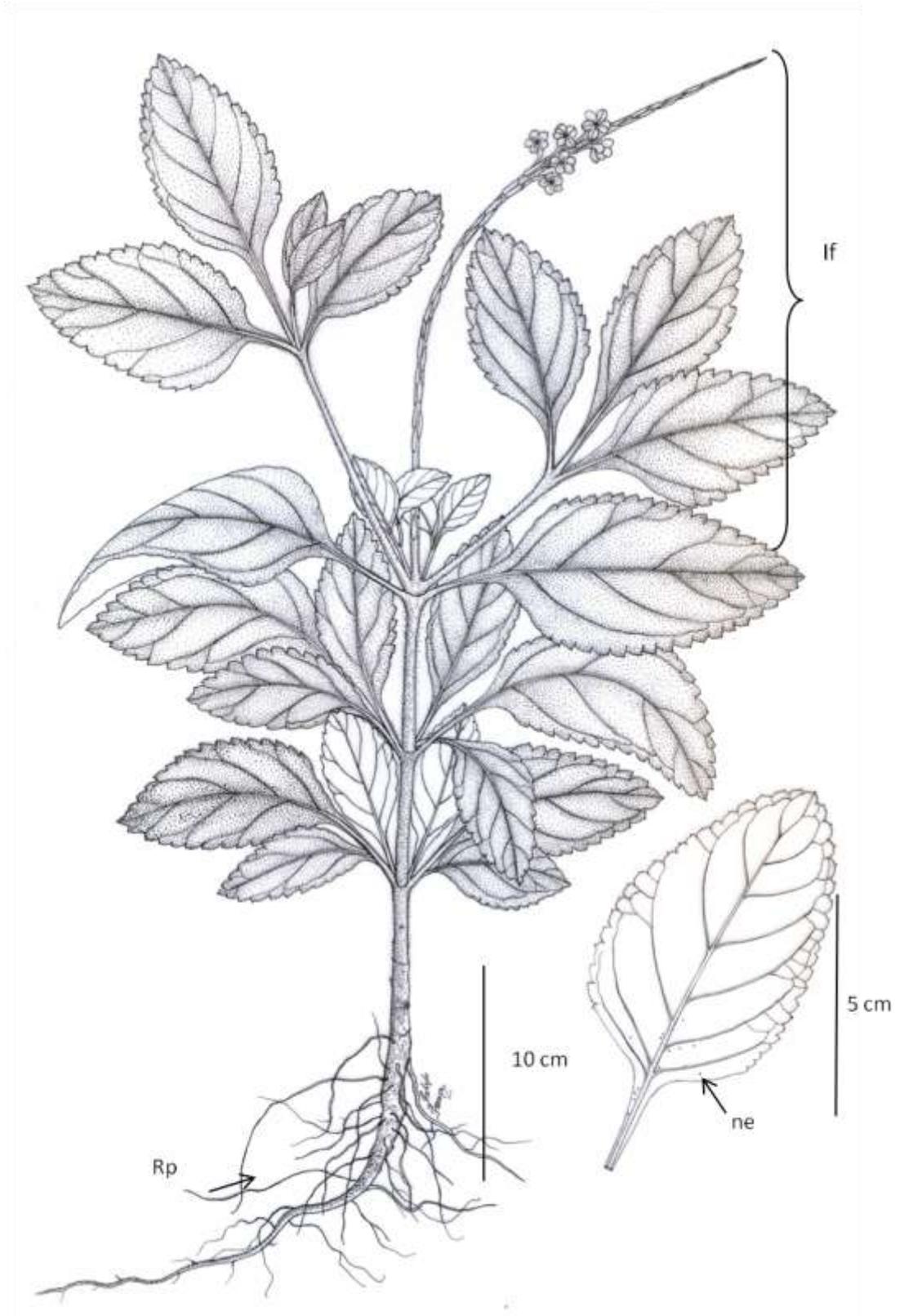


Figura 2. Ilustração das partes vegetativas e reprodutivas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. Rp: Raiz primária, If: inflorescência, ne. Nectários extraflorais.

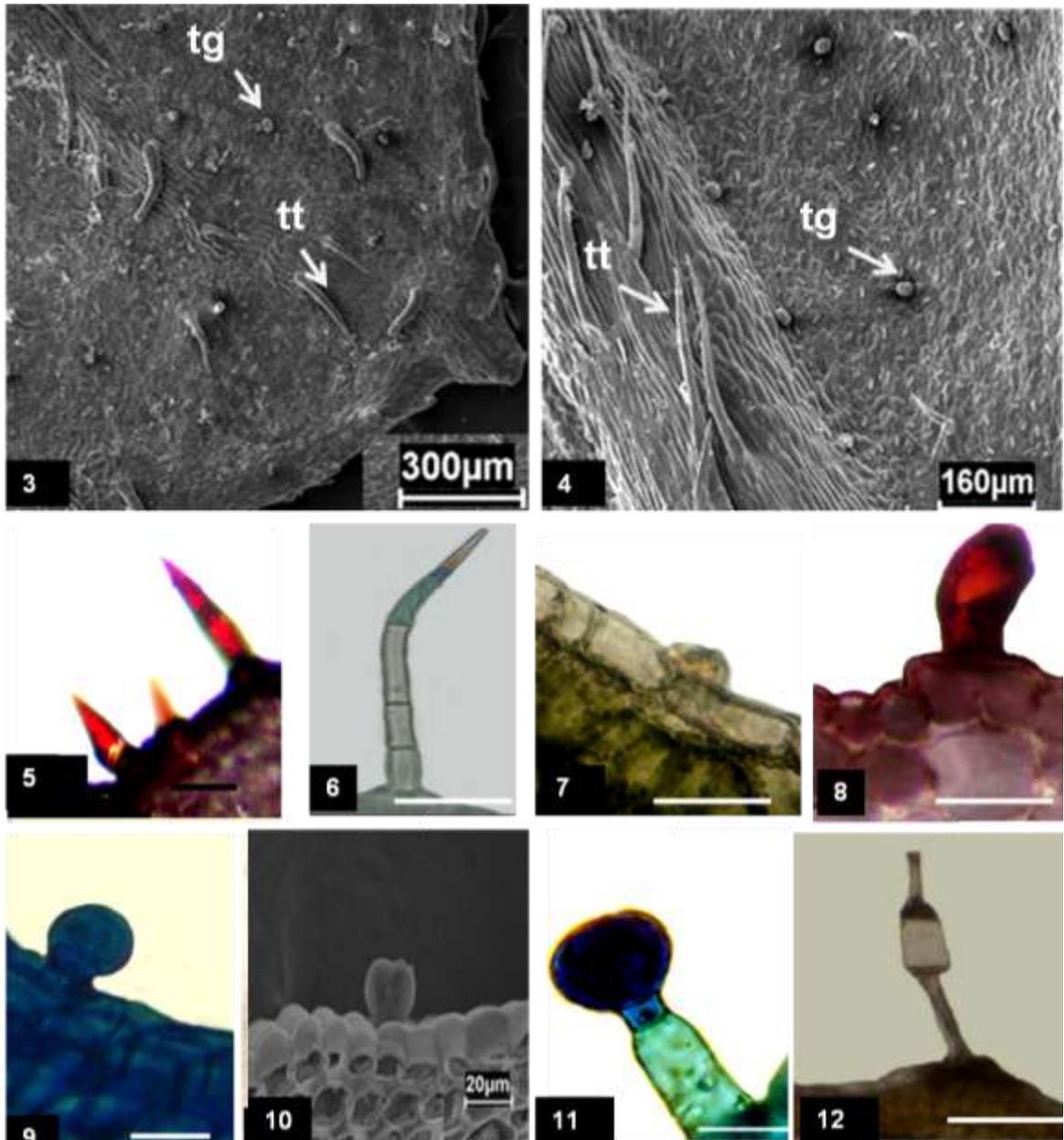
Folha

A lâmina foliar é revestida por tricomas tectores (Figuras 3 e 4) e glandulares (Figuras 5 a 12) em ambas as faces, e somente na face abaxial (região basal) foram encontrados nectários extraflorais (Figura 13).

Quanto à morfologia os tricomas tectores podem ser: unicelulares com ápice agudo e base alargada (Figura 5) ou pluricelular, filiforme, unisseriados, cônicos, constituídos de 2 a 8 células com ápice agudo (Figura 6). Estes tricomas ocorrem em média de 10,93 tric.mm² na face adaxial e em média de 9,9 tric.mm² na face abaxial.

Os tricomas glandulares são mais frequentes que os tectores são captados e foram classificados em quatro subtipos. O tipo I é séssil, apresenta uma célula basal e uma cabeça secretora (Figura 7). O tipo II é composto por uma célula basal, pedicelo curto unicelular, uma célula colar e cabeça secretora unicelular ou bicelular (Figuras 8, 9 e 10). O tipo III apresenta célula basal, pedicelo longo unicelular, célula colar e cabeça secretora unicelular ou bicelular (Figura 11). O tipo IV apresenta célula basal, pedicelo filiforme, cabeça secretora unicelular quadrangular, com ápice agudo (Figura 12). Os testes histoquímicos indicaram lipídeos nos tricomas tipo II; mucilagens nos tricomas do tipo III; e alcaloides no tipo IV. As variações morfológicas dos tricomas glandulares capitados reportam a observações já realizadas em *Lippia*, *Verbena* e *Citharexylum* (Metcalf & Chalk, 1972); *Lantana camara* L. (Passos et al., 2009), *Lippia scaberrima* Sond. (Combrinck et al., 2007). Os tricomas glandulares ocorrem em média de 14,73 tric mm² na face adaxial e 12,05 tric. mm² na face abaxial.

Quanto à localização dos tricomas glandulares apresentam-se distribuídos principalmente na face abaxial. De acordo com Passos et al. (2009) trata-se de uma estratégia das plantas aromáticas quando encontram-se em ambientes ensolarados, como forma de reter por mais tempo as secreções dentro da planta.



Figuras 3-12. *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. **3-4** Vista frontal das epidermes foliares (MEV), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg). **5-12** Secções transversais da lâmina foliar. **5**. Tricoma tector unicelular. **6**. Tricoma tector pluricelular filiforme. **7**. Tricoma glandular tipo I evidenciando alcaloides na cabeça secretora. **8**. Tricoma com reserva de lipídeos evidenciado pelo sudan IV. **8-10**. Tricomas glandulares tipo II. **11**. Tricoma glandular tipo III evidenciando mucilagem pela reação com o azul de metileno. **12**. Tricoma glandular tipo IV, com reação positiva para alcaloide na região apical (cabeça secretora). Barras= 100 µm (5, 6, 7, 8, 9, 11, 12).

Particularmente na região basal da face abaxial da lâmina foliar podem ser observados nectários extraflorais cuja morfologia em vista frontal é circular com borda proeminente e depressão central. Em corte transversal apresentam forma de taça com três regiões distintas: apical, intermediária e basal. A região apical é constituída por células colunares em paliçada com núcleo grande e esférico; a região intermediária é formada por uma grande célula poligonal revestida por cutícula em toda sua extensão, mais espessa nas paredes periclinais; a região basal é constituída por uma camada de células epidérmicas com citoplasma denso (Figuras 13 a 21).

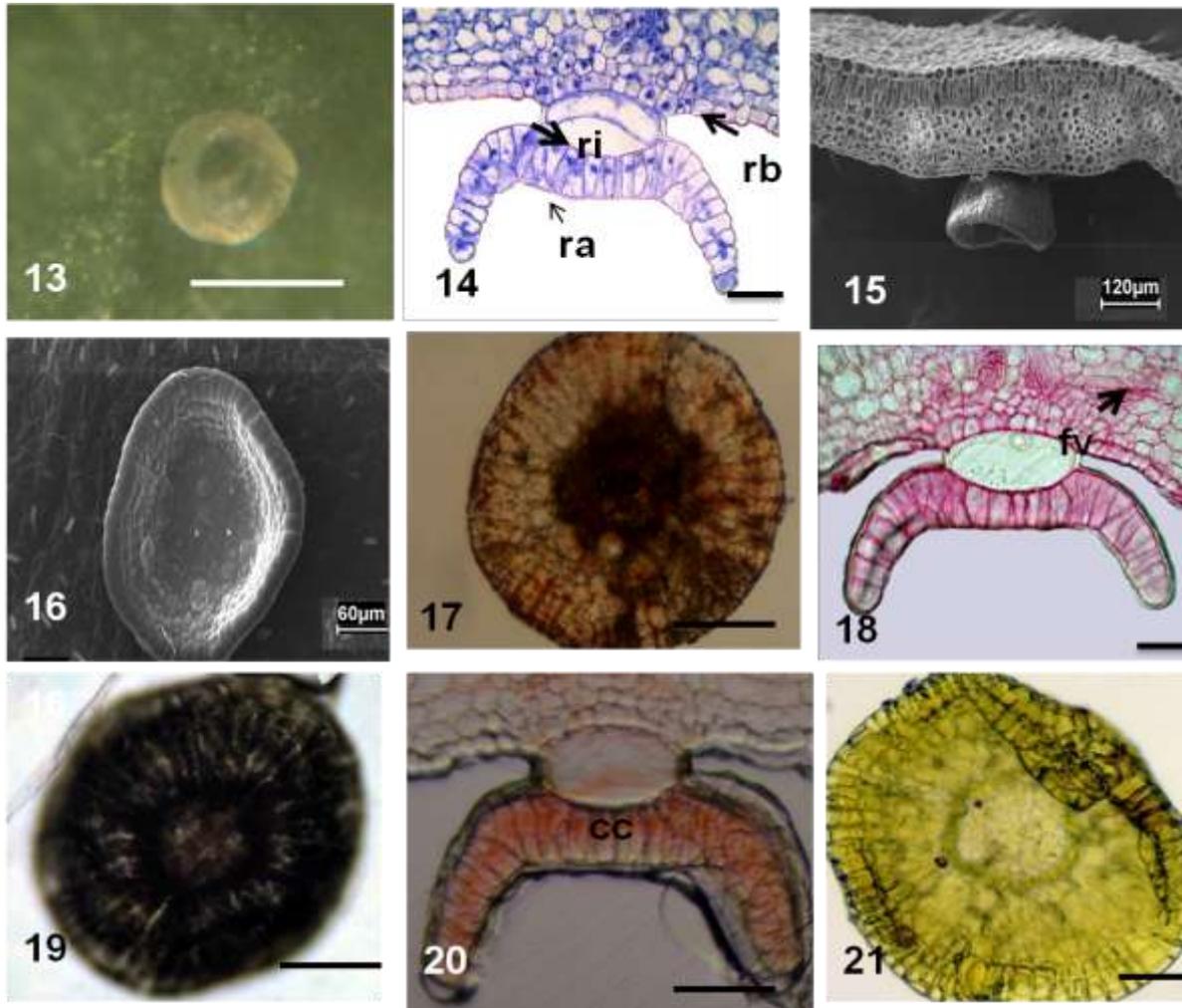
Metcalf & Chalk (1972) descrevem que tais estruturas são comuns à família Verbenaceae sendo denominada de nectários extraflorais existentes nas superfícies foliares de *Amasonia*, *Baillonia*, *Calicarpa*, *Casselia*, *Duranta*, *Lampaya*, *Monochilus*, *Rhaphithamnus* e *Stachytarpheta*.

Os testes histoquímicos indicaram a presença de outras substâncias tais como: lipídeos (Figura 17), pectinas estruturais (Figura 18), compostos fenólicos (Figura 19), proteínas estruturais (Figura 20) e açúcares (Figura 21).

Os resultados demonstram que os nectários extraflorais de *S. cayennensis* podem ter relações com mecanismos de defesa contra herbivoria. Estudos mais aprofundados (ontogenia) podem elucidar a produtividade em metabólitos secundários desta estrutura, nas diversas fases do desenvolvimento da folha, pois há relatos para as verbenáceas de variação quanto à composição dos exsudados (Machado et al., 2008; Machado & Gregório, 2010).

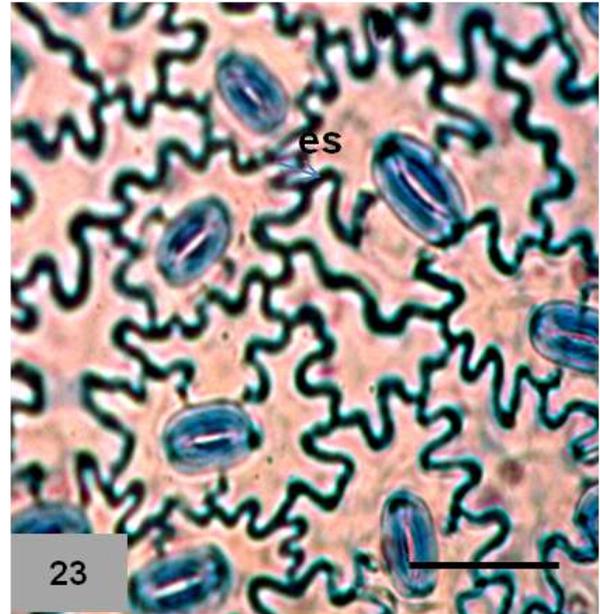
Machado (1999) ao avaliar o desenvolvimento morfológico e ultraestrutural de nectários extraflorais de *Citharexylum myrianthum* Cham, observou que a

produção de néctar ocorre no período de expansão foliar e nos demais estágios os nectários extraflorais assumem função de glândula secretora de lipídeos.



Figuras 13-21. Nectário extrafloral de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 13. Aspecto morfológico do nectário em vista frontal. 14. Corte transversal evidenciando a estrutura do nectário extrafloral em vista frontal com região basal (rb), intermediária, região apical (ra). 15. Disposição do nectário sobre a lâmina foliar (MEV). 16. Vista frontal da região apical (MEV). 17. Vista frontal evidenciando presença de lipídeos na região central e paliçada, depressão central (dc). 18. Mucilagens estruturais e feixes vasculares duas camadas abaixo da epiderme (fv). 19. Compostos fenólicos na região apical. 20. Proteínas estruturais nas células colunares (cc). 21. Nectário extrafloral com reação para açúcares. Barras= 1mm (13), 60 µm (16); 120 µm(15), 100 µm (14, 18, 19, 20); 5 µm (17 e 21).

Os estômatos de *S. cayennensis* são anomocíticos e diacíticos. Metcalfe & Chalk (1972) relatam a existência de mais de um tipo de estômato em outros gêneros da família (*Amasonia*, *Casselia*, *Baillonia*). A folha é anfi-hipoestomática com uma média de estômatos de 216,36 est.mm² na face abaxial e 313,46 est.mm² na adaxial. As células epidérmicas apresentam variações no tamanho e expressiva sinuosidade nas paredes celulares principalmente na face adaxial (Figuras 22 e 23).

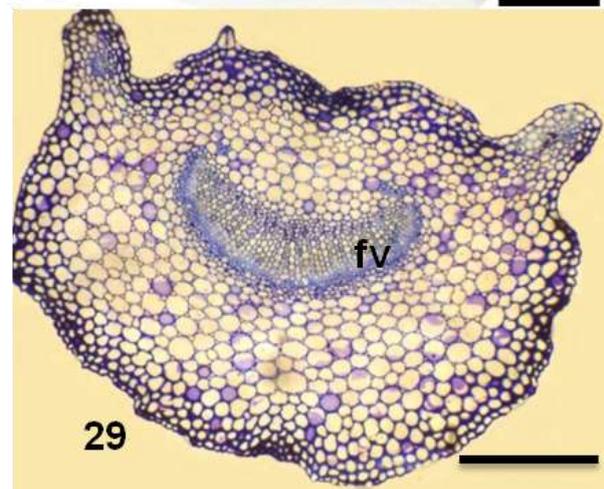
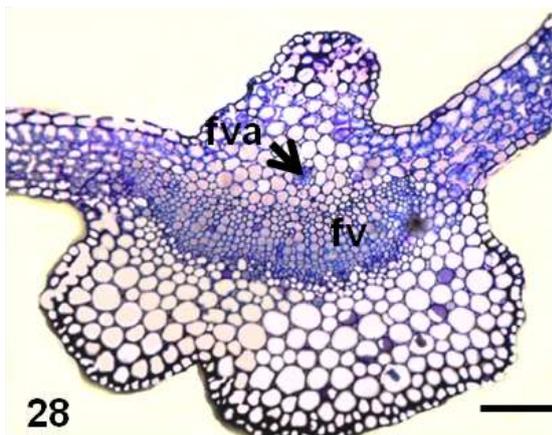
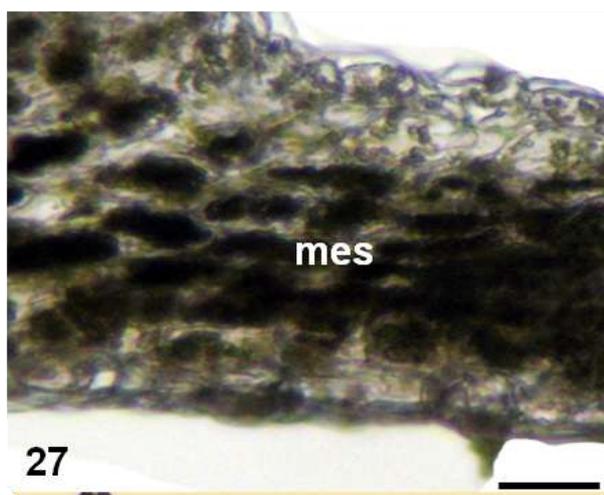
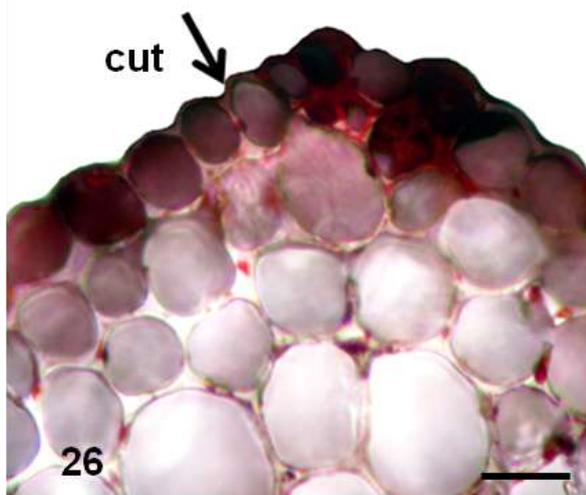
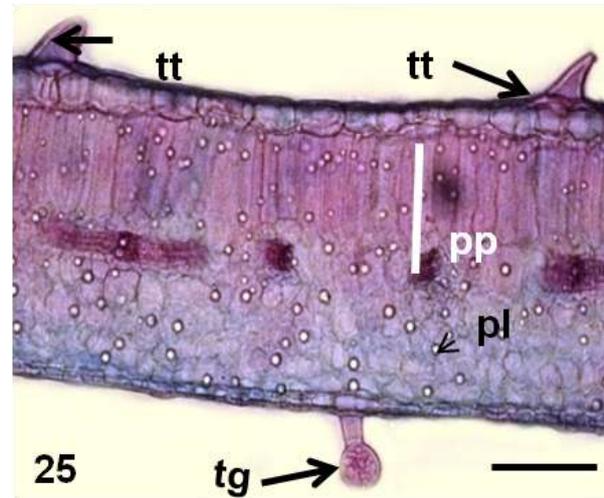
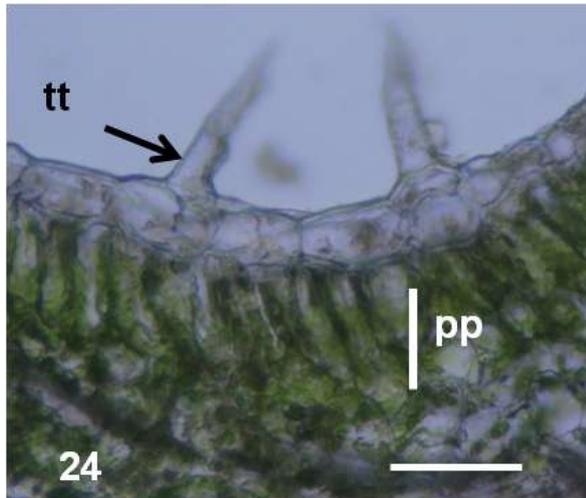


Figuras 22-23. *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 22. Vista frontal da epiderme com tricoma tector filamentosos (tt). 23. Estômato anomocítico (es). Barras= 100 μ m (22 e 23)

Secções transversais da lâmina foliar evidenciam uma epiderme uniestratificada (Figuras 24 e 25) com cutícula espessa (Figura 26). O mesofilo é dorsiventral com parênquima paliçádico (Figura 25) ocupando cerca de metade da face adaxial e o parênquima lacunoso com três a quatro camadas de células com reservas de compostos fenólicos (Figura 27).

A nervura central possui formato convexo-convexo, o feixe vascular é colateral organizado em arco aberto e a abertura voltada para face adaxial com um feixe acessório central (Figura 28).

O pecíolo em corte transversal evidencia formato côncavo-convexo com epiderme uniestratificada coberta por tricomas tectores curtos unisseriados e revestidos por fina cutícula. Adjacente à epiderme, o colênquima apresenta-se constituído por 3 a 4 camadas de células com espessamento longitudinal sendo classificado como colênquima angular. O parênquima de preenchimento é formado por células arredondadas com variação quanto ao tamanho, apresentando poucos espaços intercelulares. O feixe vascular do pecíolo mostra-se semelhante ao da nervura central, com feixes acessórios nas laterais (Figura 29).



Figuras 24-29. Secções transversais da lâmina foliar de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 24. Epiderme e parênquima paliçádico (branco). 25. Epidermes com tricomas tectores (tt) e tricomas glandulares (tg) mesofilo evidenciando parênquima paliçádico (pp) e lacunoso (pl). 26. Cutícula (cut) da epiderme foliar. 27. Mesofilo com reservas de compostos fenólicos evidenciados pelo cloreto e férrico. 28. Nervura central com feixes vasculares (fv) feixes vasculares acessórios (fva). 29. Pecíolo. Barras = 5 µm (28 e 29); 100 µm (24, 25, 27); 200 µm (26).

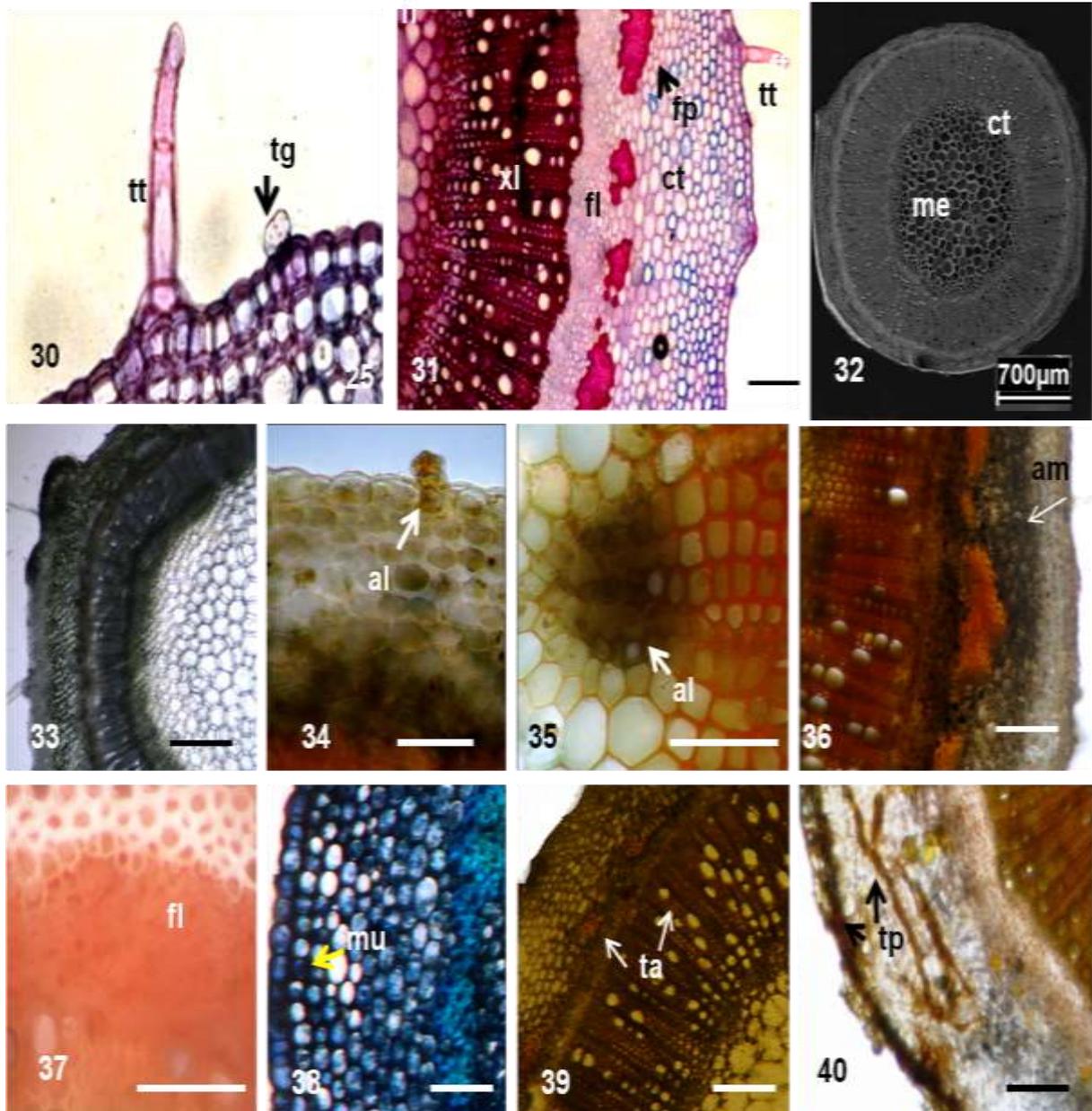
Caule

A epiderme caulinar é formada por uma camada de células poligonais recobertas por cutícula delgada. Os tricomas tectores pluricelulares e glandulares ocorrentes na superfície foliar são freqüentes no caule (Figura 30). Os testes histoquímicos indicaram a presença de alcaloides nos tricomas e células epidérmicas (Figuras 34 e 36), presença das mucilagens (Figura 38) e terpenóides (Figura 40) nas células epidérmicas.

A região cortical é formada por duas a três camadas de colênquima do tipo lamelar (Figura 31) o qual apresentou reação para alcaloides (Figura 36). O tecido parenquimático fundamental do córtex possui duas a quatro camadas de células com reservas de amido (Figura 36), taninos (Figura 39), e terpenóides (Figura 40). Nas camadas internas do córtex são encontradas fibras perivasculares em forma de ilhotas dispostas ao lado do floema (Figura 31).

O sistema vascular é contínuo, formando um anel concêntrico (Figura 32). Bierhorst (1971) descreve que secções transversais dos caules herbáceos apresentaram tal distribuição, mas que comumente há uma série de discretos feixes vasculares produzidos por baixa ou discreta atividade cambial em partes vegetativas localizadas próximas ao solo. As células que compõem o cilindro vascular indicaram a presença de alcaloides (Figura 36), proteínas estruturais (Figura 37) e taninos (Figura 39).

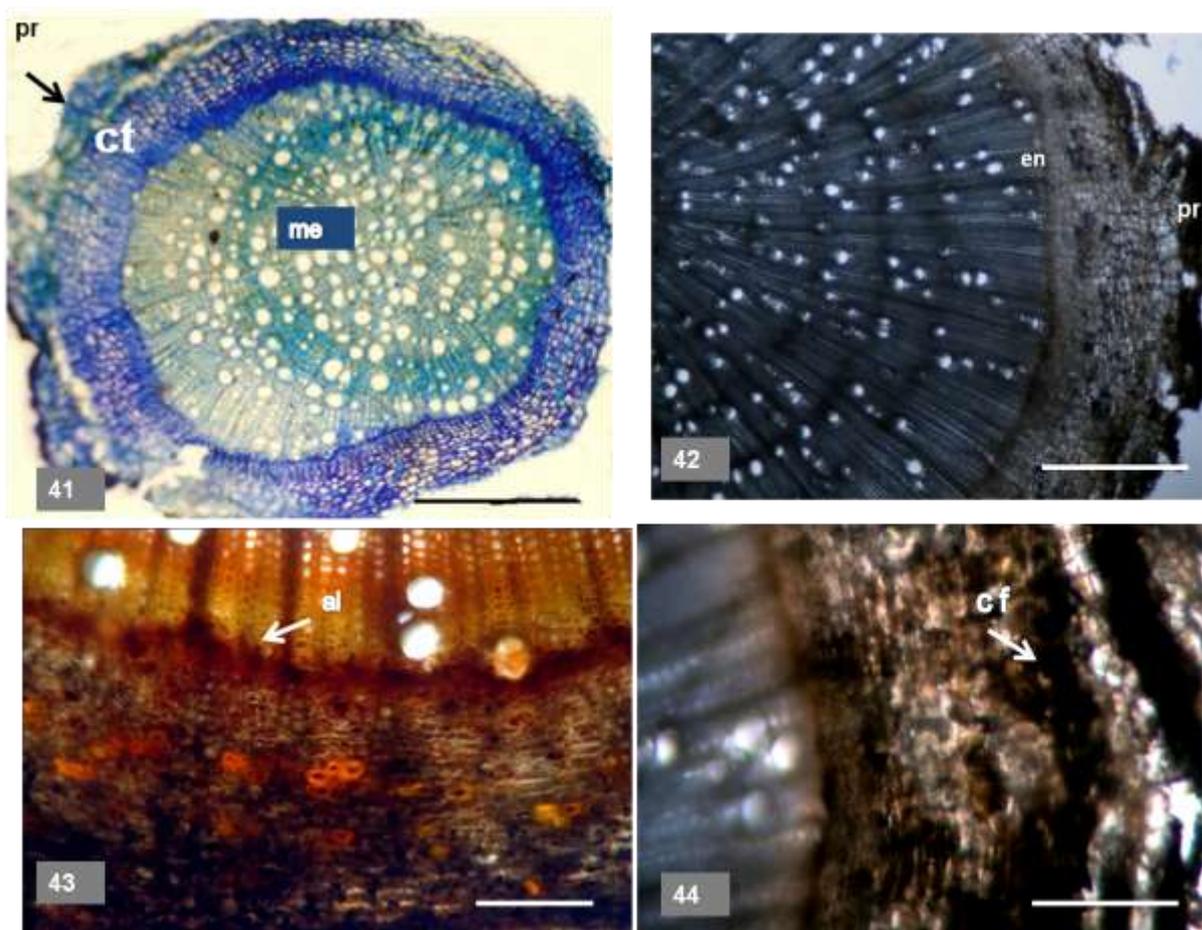
A região medular é constituída por parênquima fundamental e possui células com variações no tamanho, sendo as da região central com maior diâmetro (Figura 32).



Figuras 30-40. Seções transversais do caule de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 30. Detalhes dos tricomas tectores (tt) glandulares (tg) nas células epidérmicas. 31. Distribuição das fibras perivasculares (fp) no córtex (ct) indicadas pela reação com fluroglucinol, floema (fl) e xilema (xl). 32. Visão geral do caule (MEV), medula (me), córtex (ct). 33. Branco (córte e medula); 34. Alcaloides (al) nas células epidérmicas e nos tricomas evidenciados pelo reagente de Wagner. 35. Alcaloides (al) nos feixes vasculares 36. Amido (am) nas células do córtex. 37. Proteínas estruturais no floema. 38. Mucilagem nas células epidérmicas e córtex evidenciado pelo azul de metileno. 39. Tanino (ta) nos feixes vasculares evidenciados pela vanilina clorídrica 40. Terpenoides do grupo carbonila (tp) em células epidérmicas e no córtex (ct). Barras: 200 µm (35, 34, 37), 100 µm (30, 31, 32, 33, 36, 38, 39, 40).

Raiz

A raiz de *S. cayennensis* apresenta-se em crescimento secundário sendo constituída por súber, felogênio e feloderme, que formam a periderme (Figuras 41 e 42). O sistema vascular encontra-se disposto numa coluna central com o parênquima axial constituído de células circulares de paredes espessas (Figura 42). A região medular e a periderme reagiram com o reagente de Wagner e com o cloreto férrico indicando respectivamente a presença de alcaloides (Figura 43) e compostos fenólicos (Figura 44).



Figuras 41- 44. Secções transversais da raiz principal de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 41. Vista geral da raiz. 42. Branco. 43. Alcalóides na endoderme e nos raios xilemáticos. 44. Compostos fenólicos no córtex. pr=periderme, ct = córtex, me = medula, al= alcaloides, cf= compostos fenólicos. Barras: 5 μ m (41 e 42), 200 μ m (43, 44).

Prospecção Fitoquímica

O perfil fitoquímico estabelecido pela prospecção química dos órgãos vegetativos de *S. cayennensis* revelou a presença de compostos fenólicos, alcaloides, ácidos voláteis e saponinas, detectados principalmente na folha e no caule (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos secundários encontrados no extrato etanólico e aquoso em raízes, caules e folhas de *S. cayennensis*.

Classes de Substâncias	Extrato Aquoso			Extrato Etanólico		
	raiz	caule	folha	raiz	caule	folha
Fenóis	NR	NR	NR	-	+	-
Taninos	-	+	-		+	
Antocianinas e Antocianidinas*	NR	NR	NR	+	+	+
Chalcona e aurona*	NR	NR	NR	+	+	+
Flavonas*	NR	NR	NR	+	+	+
Leucoantocianidina*	NR	NR	NR	+	+	+
Catequina*	NR	NR	NR	-	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas*	NR	NR	NR	-	-	-
Saponina	NR	NR	NR	+	+	+
Alcalóide	NR	NR	NR	+	+	+
Heterosídeos Saponínicos	+	+	-	NR	NR	NR
Heterosídeos Cianogênicos	+	+	+	NR	NR	NR
Ácidos voláteis	+	+	+	NR	NR	NR
Heterosídeos antociânicos	-	-	-	NR	NR	NR

(+) = presença de substância (-) = ausência de substância (NR) não realizado. *flavonoides

Os resultados obtidos neste trabalho dão subsídios a estudos químicos, fisiológicos e farmacológicos, pois permitem a compreensão quanto à produção das substâncias oriundas do metabolismo secundário e como se encontram distribuídas em diferentes partes vegetativas.

As classes de substâncias encontradas neste estudo correspondem as já descritas para a família Verbenaceae pela fitoquímica, no entanto não há informações precisas quanto à distribuição dos princípios ativos ao longo dos tecidos. Dentre as constatações já descritas podem ser citados: alcaloides,

flavonóides e saponinas (Aliyu et al., 2008), polamida iridóides (Rodriguez & Castro, 1996), glicosídeos fenilpropanóides (Rodriguez & Castro, 1996; Ferreira et al., 2001), flavonóides, cardioativos, antracenosídeos, saponinas hemolíticas, taninos, catéquicos, carotenoides, óleos voláteis, cumarinas e mucilagens (Souza et al., 2005).

Estes componentes químicos fundamentam as aplicações na medicina popular de *S. cayennensis* que há tempos vem sendo utilizada por suas ações terapêuticas tais como: antimalárica (Froelich et al., 2008), antiinflamatória e anti-úlceras (Penido et al., 2006), efeito leishmanicida (Moreira et al., 2007) e redução de hipertensão e acidentes vasculares (Chigozie et al., 2008).

Além disso, estas substâncias constituem fonte de matéria-prima para o controle biológico, tendo em vista a ação das mucilagens na proteção contra a invasão microbiana devido à difícil digestão para os animais, possibilitando a redução de herbivoria (Kaufman et al., 1999); os taninos que repelem predadores devido ao sabor impalatável das estruturas vegetais (raízes, casca, folhas, frutos, sementes e na seiva) diminuindo a taxa de predação (Monteiro et al., 2005); e os terpenos por sua ação defensiva contra diferentes insetos quando presentes nas estruturas celulares (Viegas-Junior, 2003).

Comparando-se os resultados da histoquímica com a prospecção química observou-se que o caule de *S. cayennensis* é o órgão que apresenta mais classes de substâncias. Dentre as substâncias encontradas nos tecidos vegetais pela histoquímica constatou-se: os compostos fenólicos e taninos, mucilagens, proteínas, lipídeos e terpenóides. A prospecção química dos órgãos vegetativos convalidou as observações da histoquímica indicando a presença de classes químicas semelhantes em raízes, caules e folhas.

Em suma, *S. cayennensis* reserva em seus tecidos, substâncias que se encontram distribuídas em diferentes órgãos e estruturas secretoras. As informações obtidas neste estudo permitem um direcionamento para aplicações com fins biotecnológicos como de controle biológico e fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), ao Laboratório de Botânica Agroflorestal (LABAF/UFAM), à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM), ao Museu Paraense Emílio Goeldi e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical /UFAM.

REFERÊNCIAS

- ALIYU, A.B. et al. Phytochemical analyses and mineral elements composition of some medicinal plants of Northern Nigeria. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p.119-125, 2008.
- ALVES, E.O. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p 651-658, 2008.
- BIERHORST, D.W. **Morphology of Vascular Plants**. 3.ed. New York: Collier – Macmillan, 1971. 358p.
- BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 2003. 322p.
- CARIBÉ, J.; CAMPOS, J.M. **Plantas que ajudam o homem**. São Paulo: Pensamento, 1991. 321p.
- CHIGOZIE, J. et al. The hypocholesterolemic effect of *Stachytarpheta cayennensis* tea: implications for the management of obesity and hypertension. **Asian Journal of Biochemistry**, v.3, n.4, p.267-270, 2008.
- COMBRINCK, G.W. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, v.99, p.1111–1119, 2000.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et 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.
- DIAS-FILHO, M.B. et. al. Irradiance and water deficit effects on gas exchange behavior of two C3 amazonian weeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.3, p.319-325, 1995.

- FERREIRA, J.L.P. et al. Estudo morfo-anatômico entre os caules de *Lippia alba* e *Melissa officinalis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.1-2, 2003.
- FERREIRA, J.L.P. et al. Isolation of verbascoside from *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p.13-24, 2001.
- 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.
- FROELICH, S. et al. Phenylethanoide glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.517-520, 2008.
- GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochemie normal et pathologic**. 2.ed. Paris: Ganthier-Villars, 1969. 1904p.
- GERLACH, D. **Plant histochemistry and citochemistry**. New York: Academic Press, 1984. 301p.
- IKEWUCHI, J.C. et. al. The hypocholesterolemic effect of *Stachytarpheta cayennensis* tea: implications for the management of obesity and hypertension. **Asian Journal of Biochemistry**, v.3, n.4, p.267-270, 2008.
- JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: H.H. Freeman and Company, 1962. 480p.
- JESUS, N.Z.T. et al. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento - MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1A, p.130-139, 2009.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1940. 523p.

- KAUFMAN P.B.; CSEKE, L.J.; DUKE, J.A. BRIELMANN, H.L. **Natural products from plants**. London New York: CRC Press.,1999. 632p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 198p.
- LORENZI, H.E.; MATOS, F.J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 532p.
- MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v.64, p.1297-1302, 1974.
- MABBERLEY, D.J. **Mabberley's plant-book: a portable dictionary of the vascular plants, their classification and uses: utilizing Kubitzki's. The families and genera of vascular plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008, 1021p.
- MACHADO, S.R.. Estrutura e desenvolvimento de nectários extraflorais de *Citharexylum mirianthum* CHAM. (Verbenaceae). 1999. 113p. Tese de livre docência, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- MACHADO, S.R. et al. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian cerrado. **Plant Biology**, v.68. n.5, p.1-14, 2008.
- MACHADO, S. R.; GREGÓRIO 2010. Zinc iodide – osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). **Tissue & Cell**, v.33, n.1.p.72-77p.
- MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108. 1948.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1988. 126p.
- MESIA-VELA, S. et al. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl in rodents. **Phytomedicine**, v.11, n.7-8, p.616-24, 2004.

- METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, vol.2, 1972. 1500p.
- MONTEIRO, J.M. et al. Taninos: uma abordagem da química ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.
- MOREIRA, R.C.R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.1, p.59-63, 2007.
- O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltda, 1981. 316p.
- OKOKON, J.E. et al. *In vivo* antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Pharmacology Indian**, v. 40, n.3, p.111–113, 2008.
- PASSOS, J.L. Anatomia foliar das espécies *Lantana camara* e *L. radula* (Verbenaceae). **Planta Daninha**, v.27, n.4, p.689-700, 2009.
- PENIDO, C. et al. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich.) Vahl. **Journal Ethnopharmacology**, v.104, p.225-233, 2006.
- RODRIGUEZ, S.M.; CASTRO, O. Evaluación y química farmacológica de *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae). **Revista Biología Tropical**, v.44, n.2A, p.353-359, 1996.
- SALGUEIRO, J.E. **Usos e saberes: plantas medicinais no Alentejo e outros produtos naturais**. 1.ed. Lisboa: Marca, 2004. 422p.
- SALATINO, A.; SILVA, J.B. Anatomia e óleos essenciais de folhas de *Piper regnella* (Miq) C. DC. var. *regnella*. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v.3, n.1, p.95-106, 1975.

- SASS., J.E. **Botanical microtechnique**. Ames: Iowa State College Press, 1951.
- SANTOS, J.S. et al. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.4, p.985-998, 2009.
- SILVEIRA, L.M.S. et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina - resistente isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.4, p.299-301, 2007.
- SOUZA, P.A.S. et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachyrtarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, p.922-928, 2010.
- SOUZA, T.J.T et al. Análise morfo-histológica e fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, n.2, p.209-214, 2005.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática - guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704p.
- THEOBALD, W.L. et al. Trichome description and classification. In: METCALFE CR, CHALK L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, v.1, p.40-53, 1979.
- VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400. 2003.

**CAPÍTULO III: Aspectos Estruturais, Histoquímicos e Fitoquímicos
de órgãos vegetativos de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King &
H.Rob. (japana) (Asteraceae)**

Artigo para submissão à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

**Aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos de
Ayapana triplinervis (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) (Asteraceae)**

RESUMO: *Ayapana triplinervis* variação branca é uma erva empregada na medicina popular para o tratamento de problemas cardíacos, digestórios e pneumológicos. Em se tratando de uma espécie que pertence à família Asteraceae cuja produtividade em metabólitos secundários é bastante representativa, pretendeu-se com este estudo ressaltar aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos de órgãos vegetativos (folha, caule, raiz) de *A. triplinervis* como forma de identificar aspectos fisiológicos de produtividade, armazenamento e localização de substâncias no interior do vegetal dando subsídios a estudos de caráter taxonômico, agrônômicos, fisiológicos e farmacognóstico. A avaliação anatômica evidenciou folha anfi-hipoestomática, com estômatos do tipo anomocítico. Foram registrados tricomas (glandulares e tectores) na epiderme da folha e do caule. Os tricomas glandulares reagiram ao teste de lipídeos e pectinas. O mesofilo é dorsiventral apresentando vários corpos lipídicos. O caule é pouco lignificado e apresenta uma disposição de feixes em forma de cilindro completo com medula bem desenvolvida. A raiz é protostélica. Estruturas secretoras na forma de ductos e aerênquima foram evidenciadas em folhas e caules respectivamente, porém sem reservas de substâncias. A histoquímica indicou a presença de proteínas totais, terpenóides, resinas, polissacarídeos, mucilagens e lipídeos nos tecidos. A prospecção química com extratos etanólico e aquoso das partes vegetativas da espécie constataram a presença de saponinas, compostos fenólicos, flavonas, alcalóide.

Palavras-chaves: metabólitos secundários, plantas medicinais, fitoquímica.

ABSTRACT: Structural and phytochemicals aspects of vegetative organs the *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) (Asteraceae). *Ayapana triplinervis* white variation is an herb used in folk medicine for the treatment of heart, lung and digestive problems. The Asteraceae family presents representative productivity in secondary metabolites. The goal this study is emphasize the structural and phytochemicals aspects of vegetative organs (leaf, stem, root) of *A. triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. as way to identify physiological aspects of productivity, storage and location of substances inside the plant giving subsidies to taxonomic character studies, agronomic, physiological and farmacognostical. The anatomical evaluation has highlighted a leaf is host-hipoestomatic, with estômatos of type anomocítico. Trichomes (glandular and tectores) were registered in the epidermis of the leaf and stem. The glandular trichomes reacted to the lipid test and pectins. The mesophyll is dorsiventral showing various lipid bodies. The stem is slightly above the ground and presents an array of cylinder-shaped beams complete with well-developed marrow. The root is protostelic. Secretory structures in the form of aerenchyma and ducts were highlighted in leaves and stems respectively but unreserved substances. The histochemistry indicated the presence of total protein, terpenoids, resins, polysaccharides, lipids and mucilage in tissues. Chemical prospecting with etanólico and watery extracts of vegetative parts of species found the presence of phenolic compounds, saponins, flavones, alkaloid.

Keywords: medicinal plants, secondary metabolites, phytochemical

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae é a maior em número de espécies compreendendo cerca de 10 tribos com 1600 gêneros. Está distribuída globalmente, ocupando os mais distintos habitats, desde regiões semiáridas a ambientes aquáticos (Hind, 2010). No Brasil, existem aproximadamente 250 gêneros e 2.000 espécies (Souza & Lorenzi, 2008).

A espécie *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. tem como sinonímia *Eupatorium ayapana* (Hattori, 2012). *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob, também conhecida como japana-branca ou japana-roxa, é uma das espécies que se destaca na medicina popular. Trata-se de uma planta nativa da América do Sul podendo ser encontrada em regiões do Amazonas, no Brasil, Equador, Peru, Guianas, Porto Rico, Havaí. Ainda é bem representada em outros países como Vietnã e Ilhas Mascarenhas (Gauvin- Bialecki & Mararodon, 2008).

A espécie é utilizada terapeuticamente como cardiotônica, diurética, hemética, laxativa, contra constipação e pneumonia (Rajasekaran et al., 2010), no tratamento de catarata, congestão, acidentes vasculares cerebrais e golpes na cabeça (Beyra, 2004). Suas folhas são utilizadas como estimulante, sudorífico, estomáquico, digestivo, antidiarreico, contra tétano, cólera, angina, infecções da boca e contra veneno de cobra (Corrêa, 1984).

Na Amazônia, é denominada como japana, lapana, aiapana, japana-branca, japana-roxa e erva-de-cobra (Borrás, 2003). Quanto às formas de uso, são relatadas diferentes formas de preparo de remédios tais como a infusão das folhas, como expectorante, contra diarreia; o sumo da folha fresca é empregada externamente na forma de banho, é considerado útil contra dores de cabeça e febre; a decocção da

folha é usada para desordem digestiva, especialmente do fígado e contra malária. A combinação desta planta com folhas de arruda (*Ruta graveolens* L.), jambu (*Acmella oleracea* L.) e abacate (*Persea americana* Mill.), são usadas na forma de infusão para o tratamento de hemorróida e verminose (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

Há registros de experimentos com extratos de éter de petróleo e extratos metanólicos das folhas de *A. triplinervis* com atividade antimicrobiana sendo que, o extrato de éter de petróleo apresentou maior atividade antibacteriana e antifúngica do que o extrato metanólico (Gupta et al., 2002). O extrato metanólico quando testado em animais revelou evolução na homeostase de tempo da hemorragia e da coagulação do sangue (Rajasekaran et al., 2010). A atividade biológica do extrato etanólico de *A. triplinervis* demonstrou formação de halos de inibição totalmente límpidos, indicando inibição total sobre *Enterococcus faecalis* (Alencar et al., 2010).

Considerando as aplicações terapêuticas e biotecnológicas atribuídas a *A. triplinervis* (variação branca), objetivou-se por meio deste trabalho, realizar a identificação das principais estruturas anatômicas e sítios de reserva de metabólitos secundários por meio da histoquímica e prospecção química fornecendo subsídios ao desenvolvimento de estudos taxonômicos, agronômicos, fisiológicos e farmacológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico utilizado no presente estudo foi cultivado no Campus Manaus Centro do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas. Foram selecionados e coletados 60 indivíduos. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Universidade Federal do Amazonas – UFAM com registro HUAM 8684.

Microscopia de luz

Para o estudo anatômico foram utilizados 10 indivíduos sendo retiradas cinco amostras das partes vegetativas (folha, caule, raízes) sendo fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético glacial, álcool etílico a 70%), conservadas em álcool etílico (70%), desidratadas em série etílica (70-100%) e infiltradas em metacrilato (Historesin, Leica). Em micrótomo rotativo os blocos foram seccionados (5 a 10 µm de espessura) e as secções foram coradas em azul de toluidina tampão citrato, pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), sendo montadas em resina sintética (Permount-Fisher).

Na preparação de lâminas semi-permanentes, foram utilizadas partes vegetativas (folha, raiz, caule) seccionadas transversalmente a mão livre, clarificadas com solução comercial de hipoclorito de sódio a 20%, coradas com azul de Astra e fuccina e montadas em glicerina (Kraus & Arduin, 1997).

Na dissociação da epiderme, foram retiradas secções do ápice, bordo e base da lâmina foliar sendo submetidas à solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (70-100%) durante quatro dias. Em seguida, lavadas em álcool etílico e, posteriormente, coradas com solução aquosa azul de astra e safranina 1%, e montadas em glicerina (Kraus & Arduin, 1997).

A contagem dos estômatos e tricomas foi efetuada em 30 campos por folha, tomados aleatoriamente, num total de 15 folhas, para as duas faces da epiderme (abaxial e adaxial), utilizando-se microscópio óptico Carl Zeiss (aumento de 400x). A classificação dos tricomas foi feita com base em Theobald (1979).

Para os testes histoquímicos, secções das partes vegetativas do material fresco que não foram submetidos a reagentes foram fotografadas a fim de documentar a coloração original dos tecidos analisados (branco). Secções controle foram realizadas simultaneamente, de acordo com a metodologia descrita nos protocolos. As classes de metabólitos investigadas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados em amostras frescas do material

Metabólitos Secundários		Cor	Reagentes/autores
Lipídeos	lipídeos totais	vermelha	Sudan IV (Gerlach, 1984)
Compostos Fenólicos	compostos fenólicos gerais	verde, púrpura, azul, negro	Cloreto Férrico III/ (Johansen, 1940)
	taninos	vermelha	Vanilina Clorídrica (Mace e Howell, 1974)
	lignina	vermelha	Floroglucinol (Johansen, 1940)
Alcaloides	Alcaloides	castanho-avermelhado	Wagner/ Furr & Mahlberg, 1981
	amido	roxa	Lugol/ (Jensen, 1962)
Polissacarídeos	mucilagens	azul turqueza verde escuro a marron	Azul de Metileno/ (Salatino & Silva, 1975)
	pectinas	rosa	Vermelho de rutênio/ (Johansen, 1940)
Proteínas	proteínas estruturais	laranja	Xilidine Ponceau/ (O'Brien e McCully, 1981)
Terpenóides	óleos essenciais e óleo-resinas	azul (essência), vermelha (resina), violeta (essência+resina)	Nadi (David e Carde, 1964)
	grupo carbonila	vemelho alaranjado	2-4-dinitrofenilhidrazina/ (Ganter & Jollès, 1969; 1970)

Eletromicrografia de Varredura (MEV)

Para a obtenção das eletromicrografias de varredura, parte das amostras dos órgãos vegetativos fixadas foi subdividida em peças de 100 mm², desidratada em série etílica crescente de acordo com Johansen (1940), processada em secador de ponto crítico de CO₂, aderida em suportes metálicos através de fita de carbono dupla face e metalizada com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura por 150 segundos em corrente de 25 mA. A observação e a captura de imagens foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém), em microscópio eletrônico de varredura LEO modelo 1450 VP, com aceleração de voltagem de 15 KV, sendo as escalas micrométricas projetadas nas mesmas condições ópticas.

Fitoquímica

Para a triagem fitoquímica foram utilizados 50 indivíduos, sendo processadas partes vegetativas (folha, caule e raiz) de *A. triplinervis* segundo a metodologia de Matos (1988). Para avaliação do extrato aquoso, 40g do material vegetal seco e triturado foram pesados. Procedeu-se a extração com água, em seguida levado ao banho-maria por 1 hora a 70°C, posteriormente filtrado, sendo o volume completado para 200 mL com o líquido extrator.

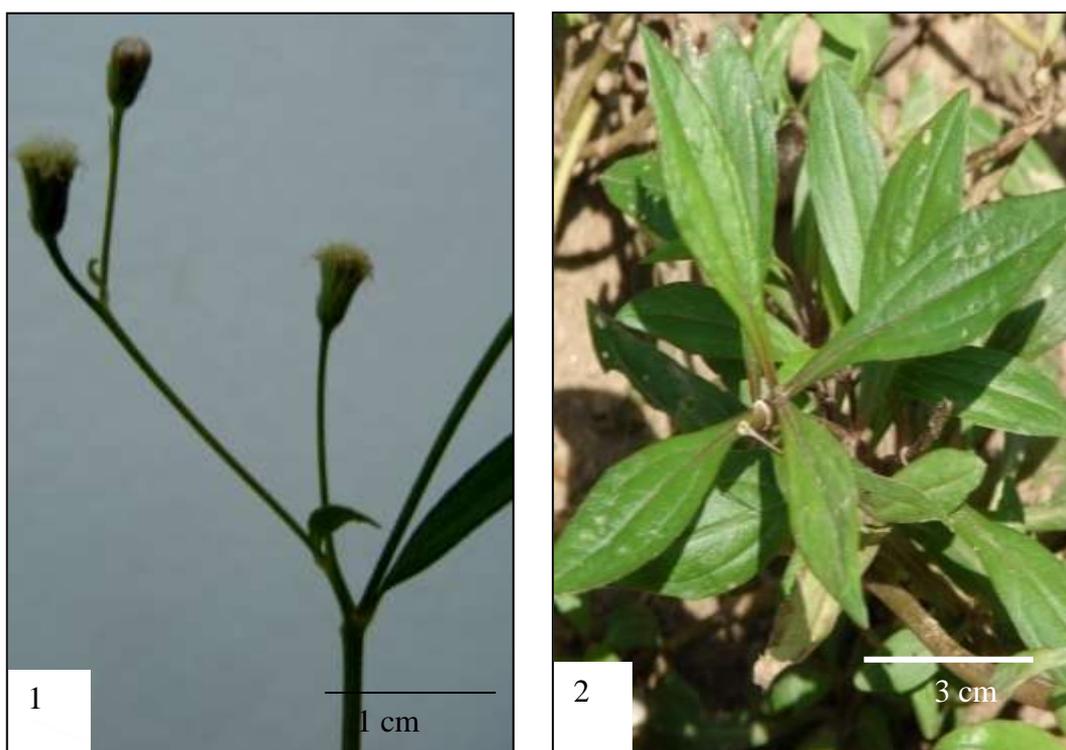
O extrato aquoso foi submetido a testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogénéticos, taninos, amido, grupos de ácidos fixos e ácidos voláteis.

Para a avaliação do extrato alcoólico foram pesadas as serragens e em seguida submetidas ao processo de maceração a frio, utilizando solução etanol em seguida filtrado. As soluções foram submetidas ao rotaevaporador, sendo posteriormente congeladas e liofilizadas. Os extratos etanólicos proporcionaram reações químicas de caracterização (precipitação e coloração) de flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas, saponinas, heterosídeos quando submetidas a reagentes específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Descrição Morfológica

A espécie *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. é uma erva de 40-50 cm de altura, ereta ou semi prostrada com caule cilíndrico, piloso, coloração verde variação “branca”. As folhas são simples, sésseis, opostas com limbo ovado-lanceolado, ápice agudo, base decorrente. Inflorescência em forma de capítulos brancos com 6 a 12 mm de diâmetro e 20 a 30 flores (Figuras 1 a 3).



Figuras 1- 2. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 1. Inflorescência. 2. Ramos foliares.

De acordo com Nery (2011) existem diferenças morfológicas para japana variação branca e roxa, indicando que as mesmas diferem-se em função da cor do caule e da nervura das folhas, base da folha, distância dos entrenós, ramificação e presença de brotos foliares que se apresentam em maior quantidade no tipo branca.

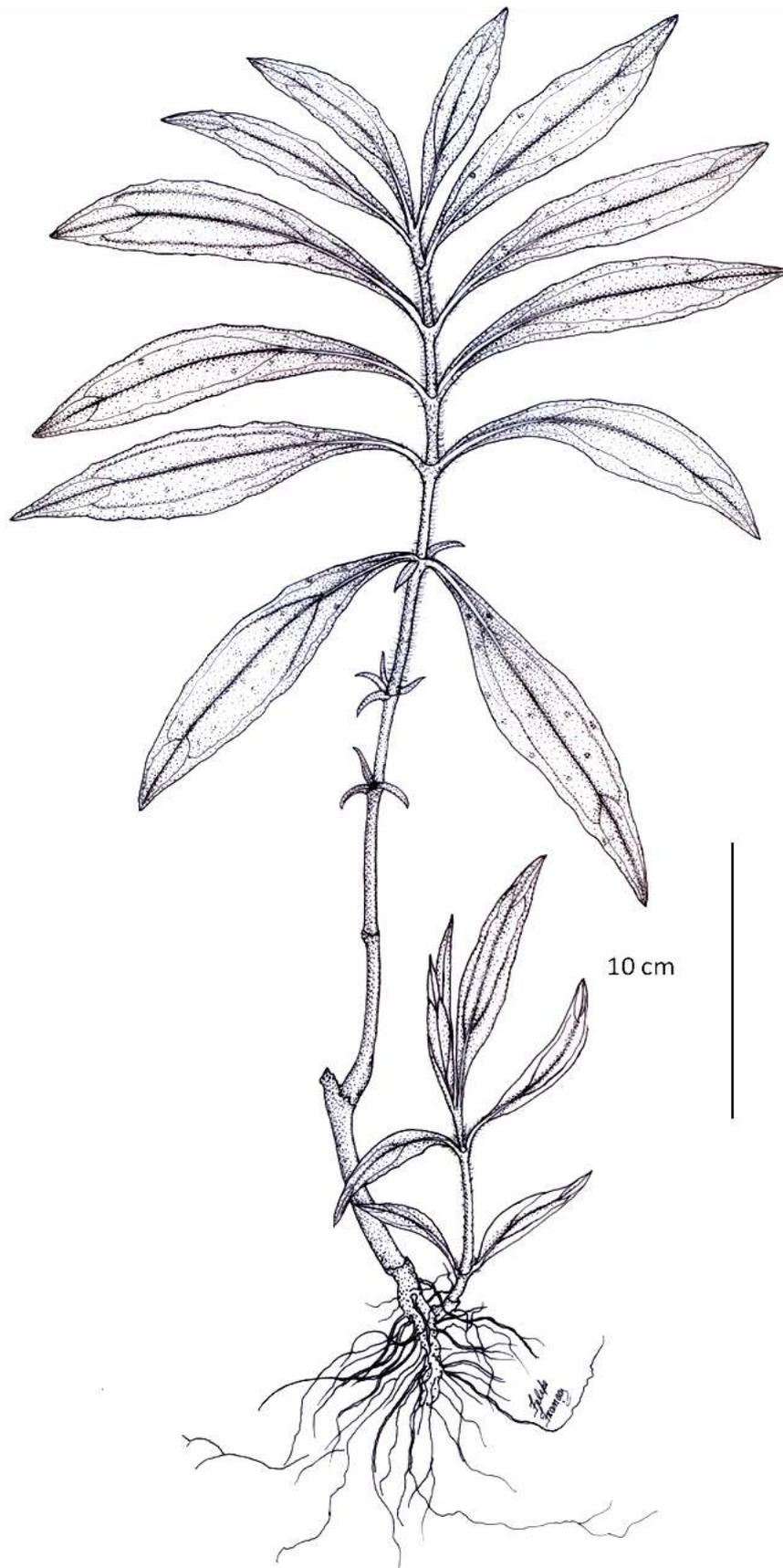


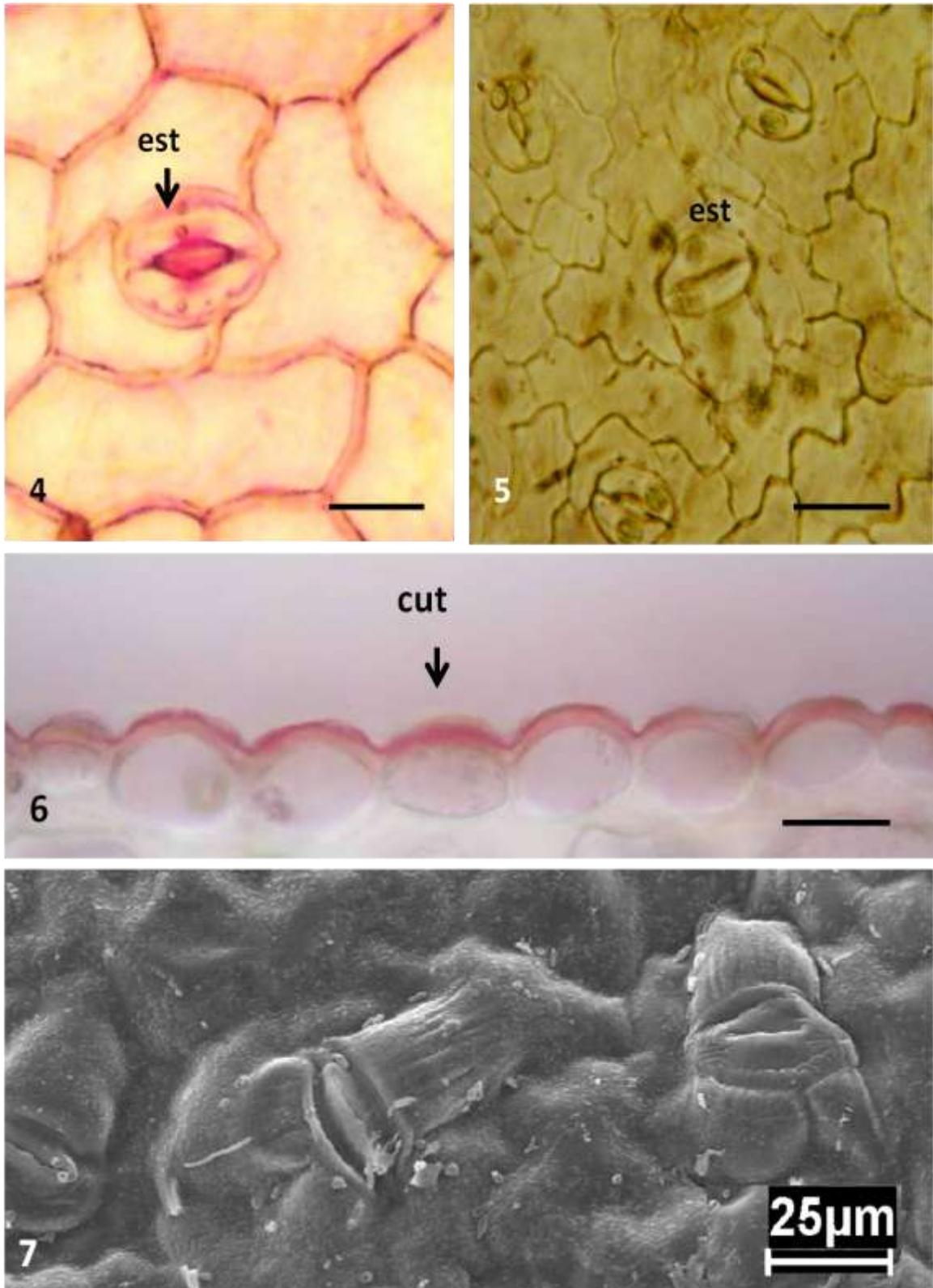
Figura 3. Ilustração geral do hábito de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob.

Folha

Em vista frontal, as células epidérmicas possuem paredes anticlinais retas a levemente sinuosas na face adaxial (Figura 4). As células epidérmicas da superfície abaxial apresentam contorno sinuoso (Figura 5). A epiderme foliar é revestida por delgada camada de cutícula (Figura 6) que exibe estriações dispostas perpendicular e paralelamente aos estômatos (Figuras 7).

De acordo com Nery (2011) a sinuosidade das paredes celulares são características resultantes do grau de luminosidade que a planta está exposta. Tais características já foram observadas por Junior et al. (2009) ao avaliarem a variação da estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) quando submetidas a diferentes condições de luminosidade.

Os estômatos são do tipo anomocítico (Figuras 4, 5 e 7), corroborando as observações realizadas para a família, como por exemplo: *Eupatorium maximiliani* Schrader ex DC. (Aoyama et al., 2005); *Mikania glomerata* Spreng. (Espindola-Junior et al., 2009); *Siegesbeckia orientalis* L. (Aguilera et al., 2004). A folha foi classificada anfi-hipoestomática possuindo uma média de 220,12 est. mm² na face adaxial 512,20 est. mm² na abaxial.



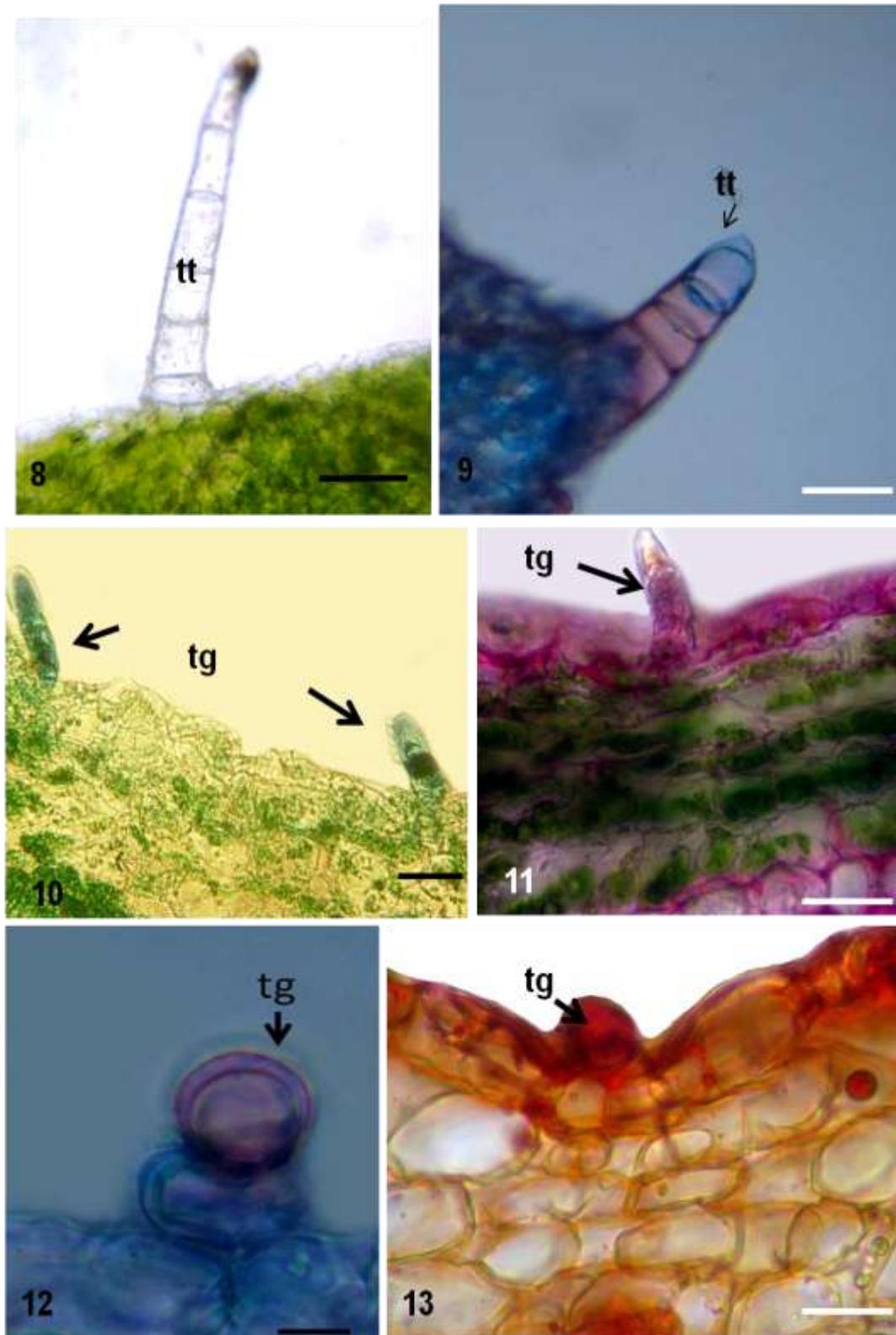
Figuras 4-7. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 4. Vista frontal da epiderme adaxial. 5. Vista frontal da epiderme abaxial. 6. Cutícula evidenciada pelo corte transversal. Estômato (est), cutícula. 7. Epiderme em vista frontal (MEV) evidenciando depressões na epiderme (cut). Barras = 100 μm (4 a 6).

A superfície foliar de *A. triplinervis* possui tricomas tectores e glandulares. Os tectores são unisseriados, multicelulares com célula basal seguidos por cinco a oito células intermediárias com uma célula apical afilada (Figuras 8 e 9) ocorrendo numa média de 13,08 tric.mm² na face adaxial e 9,13 tric.mm² na face abaxial.

Os tricomas glandulares apresentam três tipos morfológicos. O primeiro tipo é filiforme unisseriado constituído por cerca de quatro células com porção apical semelhante a um dedo, sendo classificado como digitiforme (Figura 10 e 11), estes reagiram aos testes para pectina e mucilagens. O segundo tipo é curto não ramificado tricelular formado por célula basal, célula intermediária e célula apical redonda (Figura 12). O terceiro é formado por duas células localizado em depressões na superfície epidérmica (Figura 13) com reservas lipídicas. A distribuição destes tricomas na lâmina foliar é de uma média de 12,4 tric.mm² na face adaxial e 13,6 tric.m² na face abaxial.

Os padrões morfológicos dos tricomas encontrados em *A. triplinervis* já foram descritos por Castro et al. (1997) para os gêneros *Eupatorium* e *Mikania*. Nery (2011), ressalta a existência do tricoma glandular perolado descrito para *Piper regnellii* var. *regnelli* (Miq.) C. DC. (Silva & Machado, 1999), mas que constituem uma descrição inédita para Asteraceae.

Os tricomas de *A. triplinervis* de forma geral estão localizados em depressões na lâmina foliar. Padrão similar foi observado em folhas de *Bidens*, *Aspilia*, *Mikania*, *Stevia*, *Verbenesina*, *Wedelia* e *Wulffia* por Castro et al. (1997) ao analisarem as estruturas secretoras de 72 espécies de Asteraceae.



Figuras 8-13. Tricomas tectores e glandulares observados em secções transversais da folha de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. **8.** Corte branco evidenciando tricoma tector. **9.** Tricoma tector na nervura central. **10.** Tricomas digitiformes (branco). **11.** Pectinas presentes em tricomas glandulares digitiformes. **12.** Tricoma glandular perolado. **13.** Tricoma glandular com reservas de lipídeos. Barras= 100 µm (8, 9, 10, 11,13); 200 µm (12).

O mesofilo em secção transversal é revestido por uma epiderme uniestratificada e possui organização dorsiventral com parênquima paliádico formado por, aproximadamente, uma a duas camadas de células curtas e justapostas com parênquima lacunoso constituído de três a oito camadas de células poligonais com variações de tamanho (Figura 14).

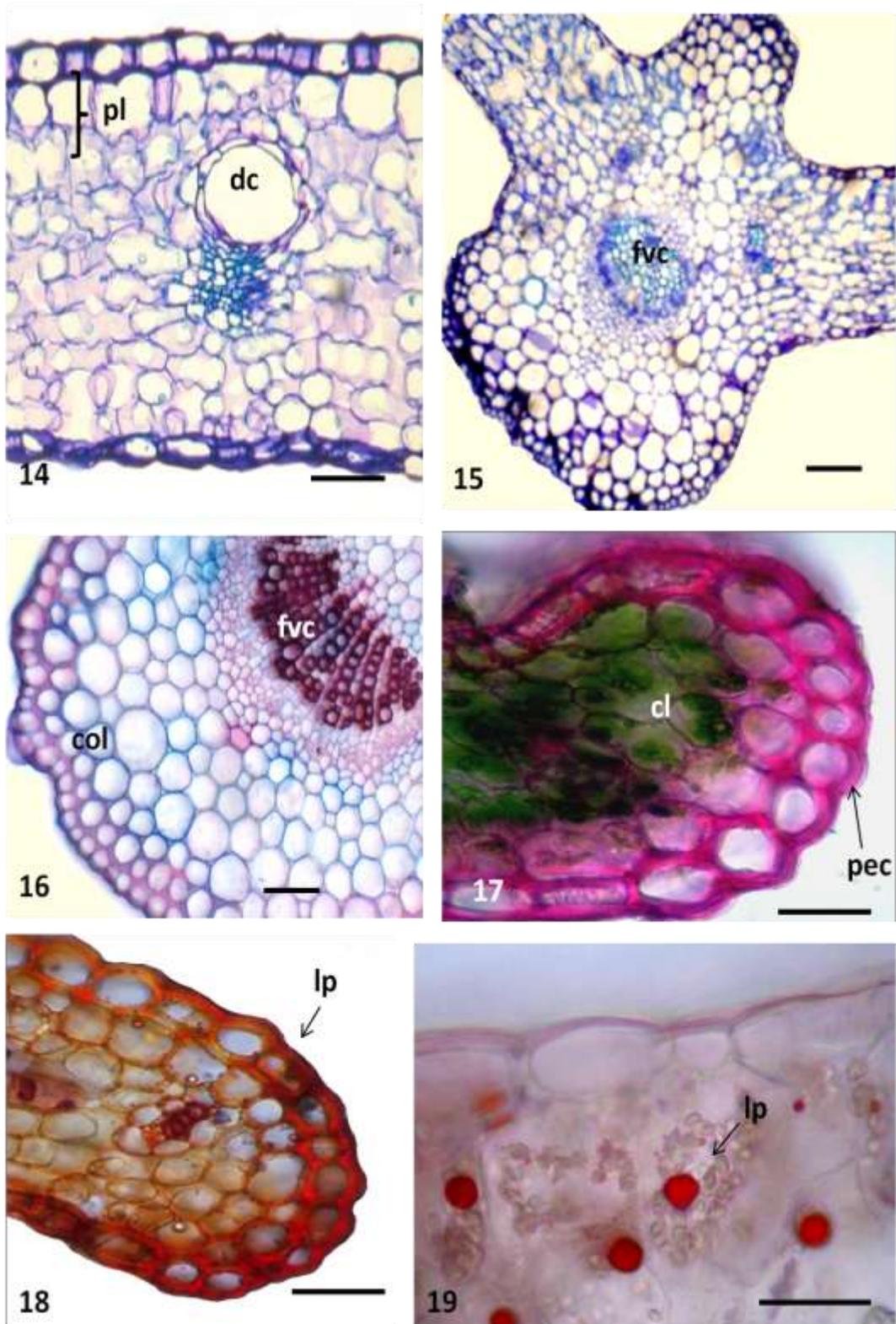
Os ductos secretores foram identificados no parênquima lacunoso próximos aos feixes vasculares. Em corte transversal apresentam forma isodiamétrica com um lúmen circundado por um único estrato de células epiteliais (Figura 14).

Castro et al. (1997) descrevem a mesma localização dos ductos sendo observados associados exclusivamente ao floema em *Inulopsis scaposa* (Remy) O. Hoffm. e *Trixis verbasciformis* Less, ou associados próximos ao xilema e ao floema ou, exclusivamente ao xilema como em: *Aspilia*, *Bidens*, *Eupatorium*, *Mikania*, *Riencourtia*, *Stevia*, *Verbesina*, *Viguiera*, *Wedelia* e *Wulffia*.

A nervura central possui formato convexo-convexo. É revestida por uma epiderme uniestratificada (Figura 15). Sob a epiderme, o colênquima angular apresenta composto por duas a três camadas de células arredondadas, tanto na face adaxial quanto na abaxial (Figura 15 e 16).

O feixe vascular é do tipo colateral (Figura 16). Em alguns feixes vasculares é possível observar a proximidade com ductos secretores (Figura 14). Lersten & Curtis (1987) referem-se a tais estruturas (cavidades e ductos) como reservatórios, considerando não o comprimento e, sim, a estocagem de substâncias na estrutura. Quanto ao conteúdo químico das cavidades secretoras localizadas ao longo do mesofilo não houve reação para nenhum dos testes realizados.

Os testes histoquímicos indicaram a presença de pectina estrutural (Figura 17) e lipídeos (Figura 18) nas paredes celulares da epiderme foliar. Ao longo do mesofilo podem ser encontrados corpos esféricos lipídicos (Figura 19). Estudos realizados por Lersten et al. (2006) com corpos de óleos em Angiospermas constatou a presença destas substâncias em *Ambrosia psilostachya* DC. (Asteraceae) estes óleos foram classificados como neutros e apresentam capacidade de não evaporar dos tecidos para o ar, não são voláteis, assumindo desta forma, a função de diminuir a superfície de tensão na célula da folha e permitindo adaptação da planta a temperatura.



Figuras 14-19. Secções transversais da lâmina foliar de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. **14.** Mesofilo; parênquima paliçádico (pl), ductos (dc). **15.** Nervura central; feixe vascular central (fvc). **16.** Colênquima (col). **17.** Pectina (pec) na parede celular das células epidérmicas visualizadas pelo vermelho de rutênio; clorofila (cl). **18.** Lipídeos estruturais (lp) nas paredes celulares das células epidérmicas visualizadas pelo sudan IV. **19.** Gotículas de lipídeos evidenciadas pelo sudan IV no mesofilo. Barras = 100 µm (14, 15, 16, 17, 18), 200 µm (19).

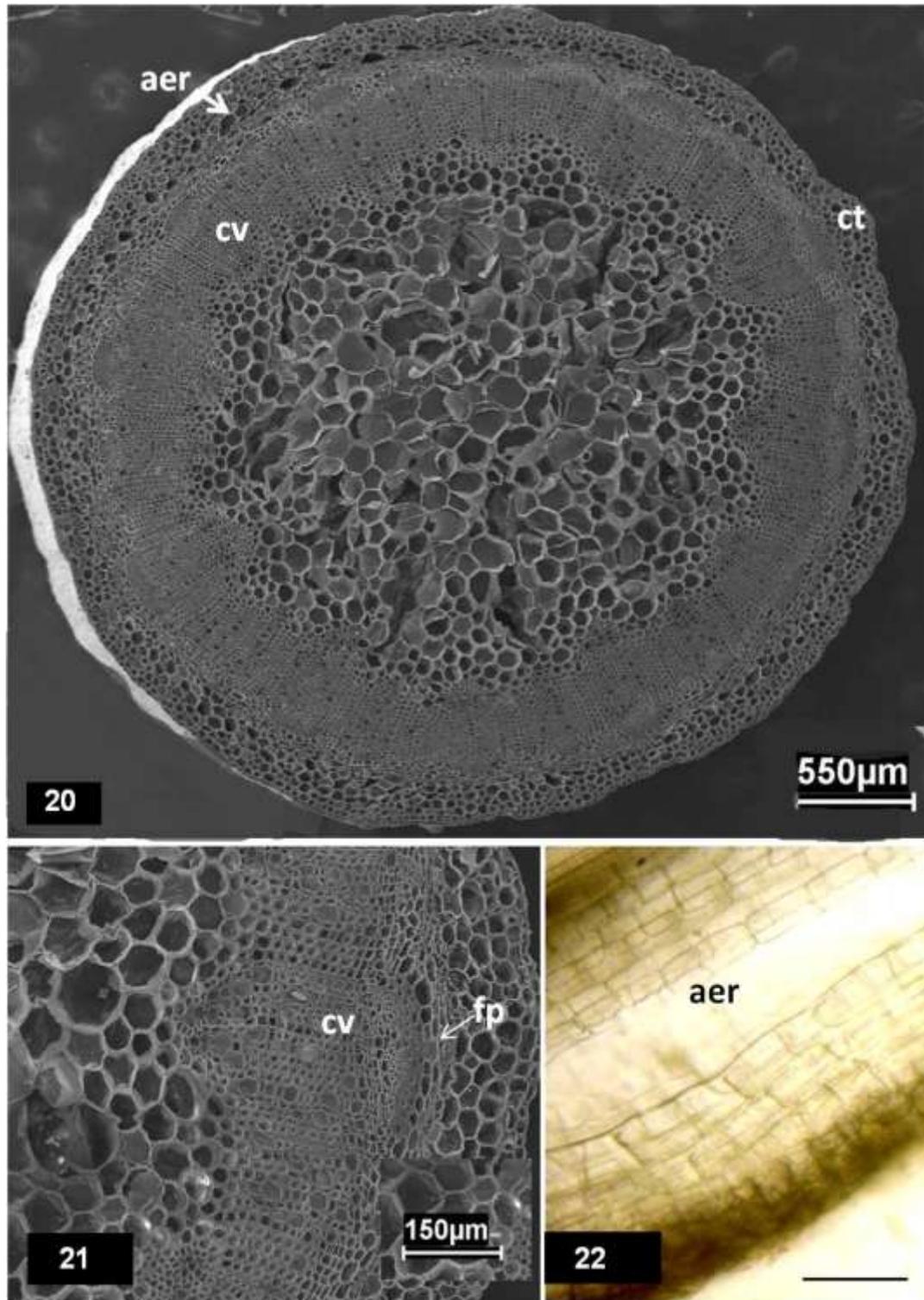
Caule

A estrutura secundária do caule em corte transversal apresenta epiderme unisseriada com células epidérmicas em formato poligonal revestida por cutícula espessa (Figura 20).

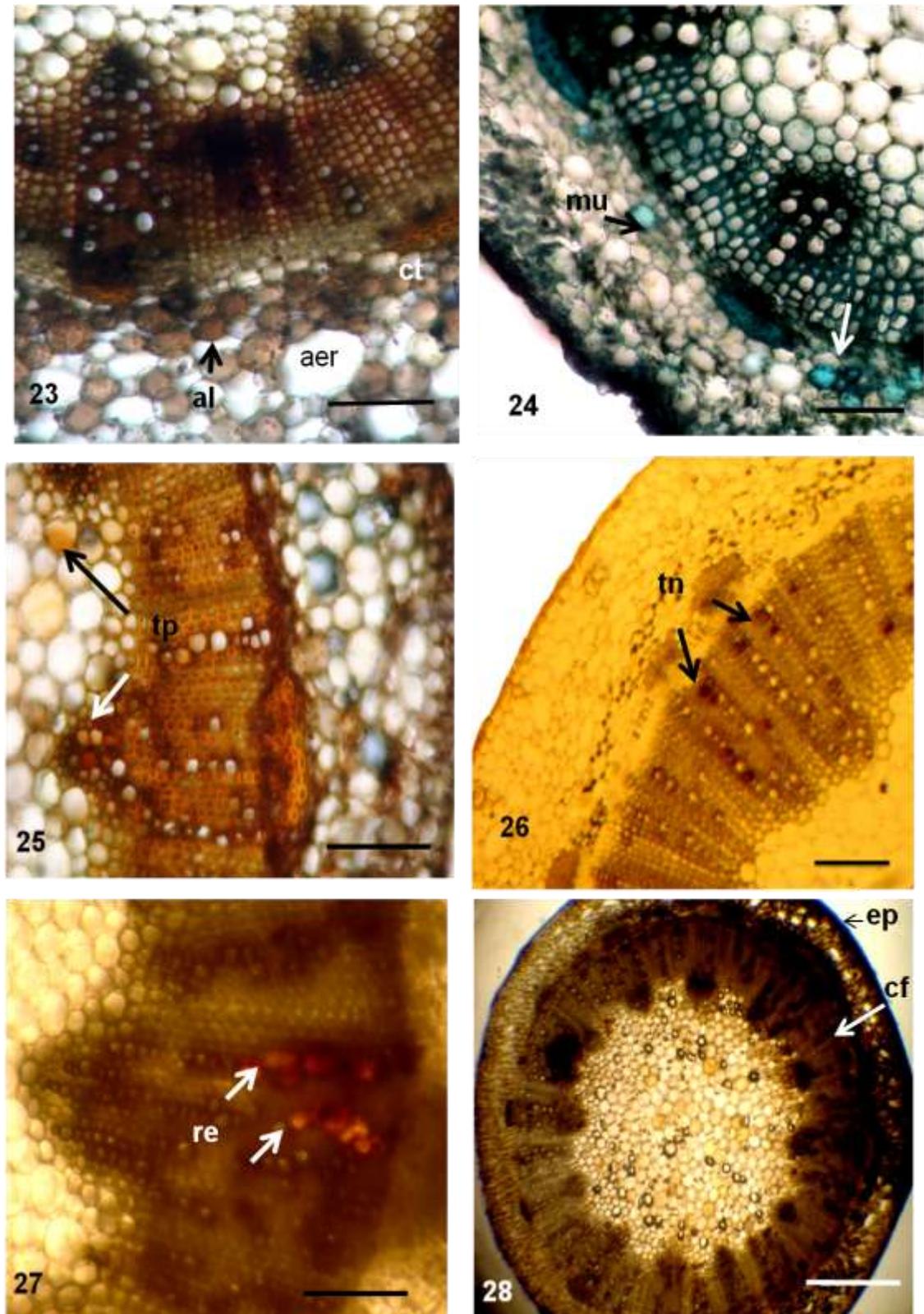
Sob a epiderme, compreendendo a região inicial do córtex, há 2 a 3 camadas de colênquima do tipo angular. Na seqüência são observadas células parenquimáticas de tamanhos regulares que reagiram ao teste para alcaloides (Figura 23) e mucilagem (Figura 24). Dispersos na região cortical são encontrados vários espaços aeríferos (Figuras 20, 21 e 22) os quais indicaram ausência de metabólitos secundários pela histoquímica realizada.

O sistema vascular é do tipo colateral com calotas de fibras floemáticas presente externamente ao floema (Figuras 20 e 21). A região medular é constituída por células parenquimáticas poligonais, com células que apresentam variações de tamanho sendo maiores na região central (Figura 20). Segundo Metcalfe & Chalk (1972) caules tipicamente herbáceos usualmente são providos de um anel simples de feixes vasculares colaterais.

Os testes histoquímicos indicaram a presença de substâncias tais como: terpenóides do grupo carbonila (Figura 25) nos feixes vasculares e células da região medular, taninos em células do feixe vascular (Figura 26), resinas nas células do feixe vascular (Figura 27) e compostos fenólicos na epiderme e no córtex (Figura 28).



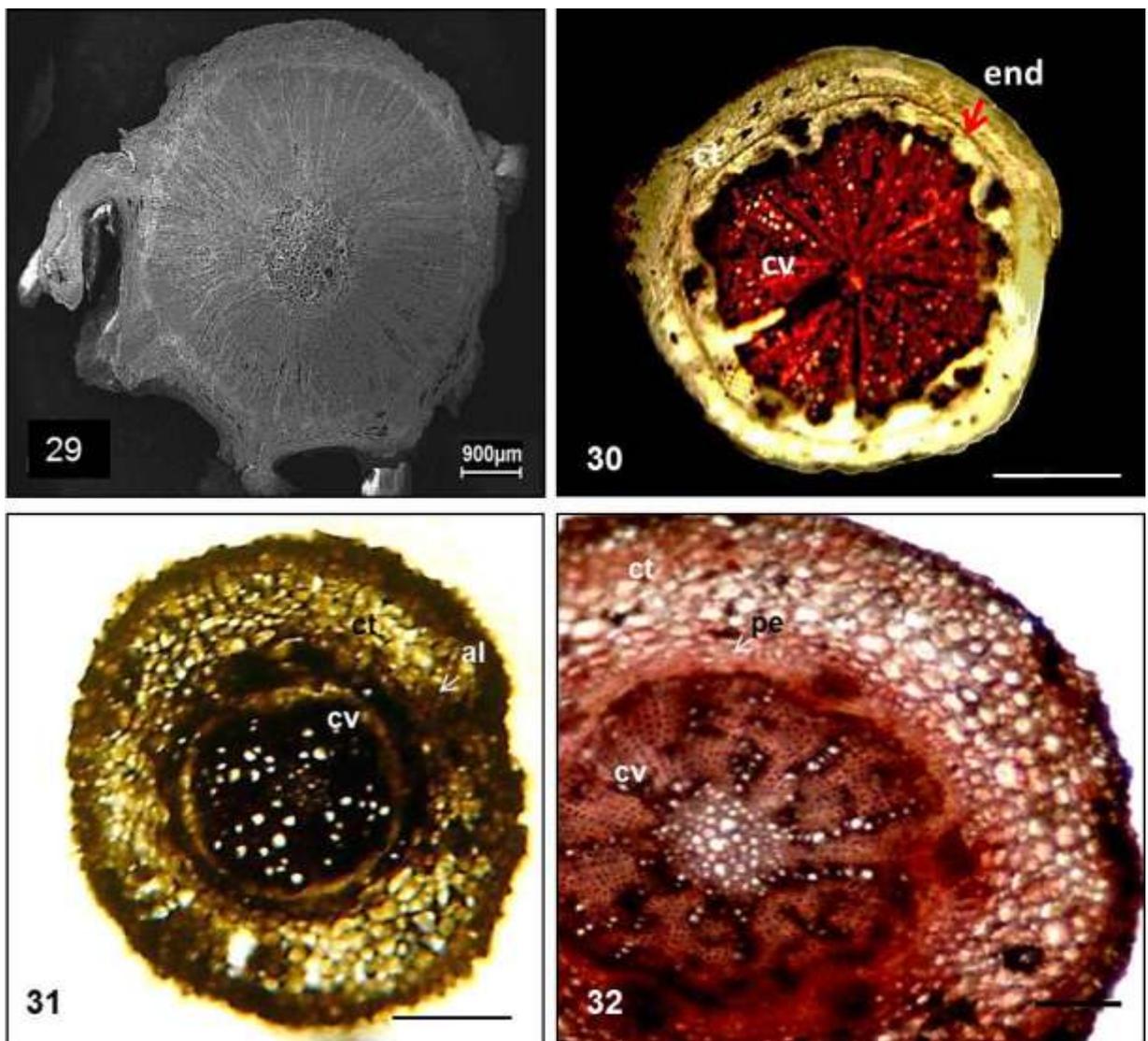
Figuras 20-22. *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 20 e 21 Secções transversais do caule (MEV), aerênquima (aer), córtex (ct), cilindro vascular (cv), fibras floemáticas (fp). 22. Secção longitudinal do caule evidenciando espaços aeríferos. Barras = 100 μm (22).



Figuras 23-28. Testes histoquímicos de secções transversais do caule em *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. **23** células do córtex com alcaloides (al) e espaços aeríferos (aer); córtex (ct); **24**. Mucilagens (mu) em células do córtex. **25**. Terpenóides (tp) na região central próximo aos feixes vasculares. **26**. Tanino (tn) nos feixes vasculares. **27**. Resinas (re) na região dos feixes vasculares. **28**. Compostos fenólicos na epiderme (ep) e córtex (ct). Barras = 100 μ m (23, 24, 25, 26, 27), 5 μ m (28).

Raiz

A raiz de *A. triplinervis* em corte transversal apresenta-se em crescimento secundário (Figura 29). A epiderme é uniestratificada revestida por cutícula delgada. O córtex parenquimático é delimitado internamente pela endoderme com estrias de Caspary (Figura 30). Entre os testes histoquímicos realizados apenas os de alcaloides (Figura 31) e de proteínas estruturais (Figura 32) tiveram resultados na região próxima ao cilindro vascular.



Figuras 29 - 32. Secções transversais da raiz de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H. Rob. 29. Visão geral da raiz (MEV). 30. Endoderme na raiz principal. 31. Alcalóides nas células epidêmicas e no cilindro central. 32. Proteínas estruturais nos feixes vasculares, Barras: 5 µm (30 a 32).

Análise fitoquímica

A análise fitoquímica do extrato aquoso e etanólico revelou a presença de classes de substâncias em diferentes partes vegetativas (Tabela 2).

Tabela 2: Compostos secundários encontrados no extrato etanólico e aquoso de *Ayapana triplinervis* (M. Vahl). R.M.King & H. Rob.

Classes de Substâncias	Extrato Aquoso			Extrato Etanólico		
	raiz	caule	folha	raiz	caule	folha
Fenóis	NR	NR	NR	+	+	+
Taninos	+	-	+	-	+	-
Antocianinas e Antocianidinas *	NR	NR	NR	-	-	-
Chalcona e aurona *	NR	NR	NR	-	+	+
Flavononas *	NR	NR	NR	-	+	+
Leucoantocianidina *	NR	NR	NR	-	+	+
Catequina *	NR	NR	NR	-	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas *	NR	NR	NR	-	+	+
Saponina	NR	NR	NR	-	-	+
Alcaloides	NR	NR	NR	+	+	+
Heterosídeos saponínicos	-	-	+	NR	NR	NR
Heterosídeos cianogênicos	-	-	-	NR	NR	NR
Ácidos voláteis	+	+	+	NR	NR	NR
Heterosídeos antocianínicos	-	-	-	NR	NR	NR

(+) = presença de substância (-) = ausência de substância (NR) não realizado. * flavonóides

Os flavonóides são pouco evidenciados nas raízes e bem freqüentes nas partes aéreas da espécie. As saponinas ocorrem de forma discreta em ambos os extratos de folhas.

As classes químicas descritas correspondem às mesmas relatadas para espécies da família tais como: triterpenos e flavonóides isolados de *Eupatorium ballotifolium* Kunth (Albuquerque et al., 2010); saponinas, flavonoides e taninos em *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Simon et al., 2005); alcaloides, flavonóides, glicosídeos antocianínicos, taninos e óleos essenciais em *Baccharis dracunculifolia* DC. (Trevisan et al., 2008); terpenos em *(M. Vahl) R.M.King & H.Rob.* (Gauvin-Bialecki & Maradon, 2008).

A ausência de substâncias nas estruturas secretoras de *A. triplinervis* pode está relacionado à volatilidade de certas substâncias que podem sofrer influência por fatores fisiológicos da planta e do próprio ambiente (Leite, 2009) principalmente se tratando da família Asteraceae cujo registro de óleo essencial se faz presente.

Para Onofre et al. (2004) plantas da família Asteraceae são alvo de investigação tanto pela composição química como pela atividade biológica, pois proporcionam desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas. Segundo Rodrigues et al. (2010) a propriedade terapêutica descrita na medicina popular deve-se a presença de saponinas. Tais substâncias têm ação no sistema imunológico e atividade de cicatrização. Restello et al. (2009) afirmam que os componentes químicos de *Tagetes patula* L. possuem atividade biológica como repelente e inseticida sobre o coleóptero *Sitophilus zeamais* Motschulsky.

Os resultados obtidos contribuem com as indicações já descritas para Asteraceae com relação à produtividade de metabólitos secundários atuantes tanto na medicina popular como no controle biológico dando subsídios a estudos químicos quanto à ocorrência e distribuição de metabólitos ao longo das partes vegetativas de *A. triplinervis*.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), ao Laboratório de Botânica Agroflorestal (LABAF/UFAM), à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM), ao Museu Paraense Emílio Goeldi e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical /UFAM.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, D.B. et al. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v.22, n.4, p.483-489, 2004.
- ALBUQUERQUE, M.R.J.; SANTOS, H.S. Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.615-620, 2010.
- ALENCAR, B.C.M. et al. Avaliação da atividade biológica de alguns extratos naturais sobre *Enterococcus faecalis*. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, IV 2010, Belém. Anais do IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CD-ROM), Belém: IFPA, 2010.
- AOYAMA E. M.; LABINAS, A. M. Estrutura foliar de *Eupatorium maximiliannii* Schrad. (Asteraceae) e suas implicações na herbivoria. **Revista de Biociências**, v.11, n.34, p.126-132, 2005.
- BEYRA, Á. et al. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales em la Provincia de Camaguey (Cuba). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v.61, n.2, p.185-203, 2004.
- BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Manaus: VALER, 2003. 322p.
- CASTRO, M.M. et al. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.20, p.163-174, 1997.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. VER Volume (vai de 1 a 6)

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et 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.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. p.177-199.

ESPINDOLA-JUNIOR, A. et al. Variação na estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v.32.n.4, p.749-758, 2009.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie Normal et Pathologic**. vol. I, vol. II. (ed.). Paris. Ganthier-Villars. 1969. 1904p.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. "Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: a good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether". **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, n.11, p.853–858, 2008.

GERLACH, D. **Plant histochemistry and citochemistry**. New York: Academic Press, 1984. 301p.

GUPTA, M. et al. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. **Fitoterapia**, v.73, n.2, p.168-170, 2002.

HATTORI, E.K.O. 2012. *Ayapana*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB117086>. Acesso: 14/02/2011.

HIND, D. J. N. Neotropical compositae (Asteraceae). **Royal Botanic Gardens**, 2010. Disponível em:

[http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Compositae_\(Asteraceae\).htm](http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Compositae_(Asteraceae).htm)>. Acesso em: 29 nov. 2011.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: H. H. Freeman and Company, 1962. 480p.

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

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.

LEITE, J.P.V. **Fitoterapia - Bases Científicas e Tecnológicas**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 328p.

LERSTEN, N.R. et al. Corpos de óleo nas células do mesofilo das folhas de angiospermas: visão geral e um levantamento selecionado. **American Journal of Botany**, v.93, p.1731-1739. 2006.

LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Asteraceae: a review and original observations on *Conyza canadensis* (Tribe Asteraceae). **La Cellule**, v.74, p.179-196, 1987.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v.52, n.11, p.2423-2426, 1974.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.126p.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1972. 1500p.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphi Pty. Ltda., 1981. 316p.

ONOFRE S.B. et. al. Atividade mutagênica de um oligopeptídeo produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* (farlow) Samson. Arq. **Ciência e Saúde**, v.8, n.1, p.7-10, 2004.

RAJASEKARAN, A. et al. Haemostatic effect of fresh juice and methanolic extract of leaves *Eupatorium ayapana* rat model. **International Journal of Biological and Medical Research**, v.1, n.3, p.85-87, 2010.

RESTELLO, R.M. Efeito do óleo essencial de *Tagetes pátula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zmais* Motschulshy (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n.2, p.304-307, 2009.

RODRIGUES, K.A.F. et al. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Caderno de Pesquisa**, v.17, n.2, p.69-76, 2010.

SALATINO, A.; SILVA, J.B. Anatomia e óleos essenciais de folhas de *Piper regnella* (Miq.) C. DC. var. *regnella*. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v.3, n.1, p.95-106, 1975.

SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p.117-124. 1999.

SIMON, F.P. et al. Caracterização farmacognóstica de *Eclipta alba* (L.) Hassk, Asteraceae (agrião-do-brejo). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.198-201, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2.ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

THEOBALD, W.L. **Trichome description and classification**. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Claredon Press, 1979. p.40-53.

TREVISAN, K. C. et al. Abordagem fitoquímica de *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, v.2, n.1, p.11-18, 2008.

**CAPÍTULO IV: Fungos endofíticos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl
(Verbenaceae) *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae) e
Costus spicatus (Costaceae)**

Artigo para submissão à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

**Fungos endofíticos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)
Ayapana triplinervis (M.Vahl) R.M.King & H.Rob.(Asteraceae) e *Costus spicatus*
(Costaceae)**

RESUMO: As plantas medicinais que fazem parte da biota da região amazônica garantem um substrato diversificado aos fungos endofíticos em função das inúmeras características específicas de cada família vegetal. O produto em metabólitos secundários resultante das interações entre plantas e fungos constituem fontes alternativas de matéria-prima na forma de moléculas bioativas que representam grandes perspectivas para a indústria farmacêutica, agrônômica e química. Este trabalho visa contribuir com a caracterização da microbiota fúngica endofítica incidente nos tecidos de *Costus spicatus*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Ayapana triplinervis*, plantas utilizadas como medicinais. Foram identificados 19 gêneros fúngicos, sendo 16 isolados de *C. spicatus*, 12 isolados de *A. triplinervis* e 10 isolados de *S. cayennensis*. Os gêneros mais frequentes são *Phacelomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*.

Palavras-chave: interações ecológicas, metabolismo secundário, microbiota fúngica.

ABSTRACT: Endophytic from *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae) *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M. King & H.Rob. (Asteraceae) and *Costus spicatus* (Costaceae). The medicinal plants that are part of the biota of the Amazon region ensure a diverse substrate Endophytes in the light of the numerous specific features of each vegetable family. The resulting product in secondary metabolites of plant-fungal interactions provides alternative sources of raw materials in the form of bioactive molecules that make up great prospects for the pharmaceutical industry, Agronomy and chemistry. This work aims to contribute to the characterization of endophytic fungal microbiota in tissues of *Costus spicatus* incident, *Stachytarpheta cayennensis*, *Ayapana triplinervis*, plants used as medicine. The fungal isolation provided the identification of fungal genera and 16 to 19 of *C. spicatus*, 12 of *S. cayennensis*, 10 *A. triplinervis*. Among the genres frequently *Phacelomyces*, *Aspergillus* found fungi, *Fusarium*, *Penicillium*, *Curvularia* *Trichoderma* .

Keywords: ecological interactions, secondary metabolism, microbiota fungica

INTRODUÇÃO

O produto do metabolismo secundário resultante das relações estabelecidas entre fungos endofíticos e os vegetais resulta em fonte de matéria-prima com aplicações biotecnológicas altamente significativas para os processos industriais (farmacêuticos, agronômicos, ambientais, alimentícios) os quais buscam substâncias com potencial antibiótico, quimioterápico e agrotóxico eficazes detentores de baixa toxicidade e com menor impacto ambiental (Strobel & Daisy, 2003, Takahashi & Lucas, 2008). Esta interação também confere diversas vantagens à planta, tais como: resistência ao estresse ambiental, alterações nas propriedades fisiológicas e produção de fitormônios (Azevedo et al., 2000; Souza et al., 2004).

Os fungos endofíticos apresentam como características a habilidade de estabelecer em certos períodos do ciclo de vida, relações assintomáticas com as plantas hospedeiras (Wang et al. 2007). Souza et al. (2004) afirmam que tais relações ainda não são bem compreendidas e podem ser classificadas como simbióticas, neutras ou antagônicas. Arnold e Lutzoni, 2007 descrevem a participação destes seres na colonização dos tecidos fotossintéticos. Em se tratando de relações harmônicas estabelecidas os nutrientes doados pela planta hospedeira são utilizados pelos fungos em rotas metabólicas e resultam em compostos com ações hormonais e/ou antibióticas úteis à planta (Takahashi & Lucas, 2008).

Os fungos de forma geral são conhecidos pela potencialidade em produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas bem conhecidas, porém a produtividade dos endofíticos ainda é pouco explorada (Suryanarayanan et al., 2009). Os registros quanto às potencialidades em moléculas bioativas dos endofíticos são alvo de investigações constante. Dentre os estudos já comprovados de fungos endofíticos podem ser citados: o *Botryosphaeria rhodina* que possui

atividade anti-inflamatória, anti-séptica e antifúngica, isolado a partir do caule da planta medicinal *Bidens pilosa* (Asteraceae) o extrato de acetato de etila do isolado deste fungo exibe atividade antifúngica significativa, bem como potentes efeitos citotóxicos e antiproliferativo contra várias linhas de células cancerosas (Abdou et al., 2010); *Taxomyces andeanae* produtor do taxol (ação contra o cancro) (Ji et al., 2006); *Edenia gomezpompae* isolado a partir das folhas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), gerou a caracterização de quatro compostos orgânicos com potencial de ação biológica contra *Colletotrichums*, *Phomopsis*, *Guignardia manguifera*, *Oomycetes*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasítica*, *Fusarium oxysporum* (Macías-Rubalcava et al., 2008).

Diante da importância da interação entre plantas e fungos endofíticos para a otimização e produção de metabólitos secundários como fonte de fitoterápicos e agentes defensivos é essencial a caracterização da comunidade de fungos endofíticos presente nos tecidos vegetais. Assim sendo utilizou-se de três espécies com potencialidades já descritas na medicina popular. As espécies estudadas foram: *Costus spicatus* (Jacq.) Sw (pobre-velho) utilizada com fins depurativos, adstringentes e diuréticos (Boorhem et al., 1999; Borrás, 2003); *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (gervão), utilizada no tratamento de diarreias, hepatopatias, nevralgia, hemorragias, anti-reumática, úlceras e dores de dentes (Salgueiro, 2004) e de *Ayapana triplinervis* (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana) utilizada por suas ações cardiotônica, diurética, hemética, laxativa, contra constipação e pneumonia (Rajasekaran et al., 2010).

As informações obtidas neste trabalho servirão de subsídios para o desenvolvimento de estudos com fins biotecnológicos atendendo demandas agrônômicas, farmacológicas e químicas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras das plantas *S. cayennensis* (Verbenaceae) e *C. spicatus* (Costaceae) foram coletadas no Campus Setor Sul da Universidade Federal do Amazonas. A espécie *A. triplinervis* (Asteraceae) foi coletada no Campus Manaus Centro do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas, IFAM.

Foram coletadas amostras de caule, raiz e folha de 10 indivíduos das três espécies em estudo. O isolamento dos fungos endofíticos foi feito de acordo com Pereira (1993). As amostras vegetativas foram fragmentadas em segmentos de 4mm² e submetidas à desinfestação superficial em álcool 70%, durante 2 min seguido de hipoclorito de sódio a 3% por 5 min e álcool 70% por 30 seg, em seguida submetidos a três lavagens com água destilada. Os fragmentos foram semeados em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (BDA) com acréscimo de estreptomicina (250mg L⁻¹) para suprimir o crescimento das bactérias. As placas foram mantidas em temperatura de (28±1 °C) sendo observadas de 1-12 dias (Pimentel, 2001; Suryanarayanan et al., 2009).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três tratamentos e 10 repetições para cada parte vegetativa avaliada totalizando 300 placas de Petri para cada espécie. A identificação dos isolados obtidos foi feita por meio da observação das estruturas reprodutivas e vegetativas e comparadas com as chaves de identificação (Barnet & Hunter; 1972, Sutton, 1980). A frequência de colonização nas plantas pelos fungos e as respectivas partes vegetativas foi calculada de acordo com Yuan et al., (2010), usando a fórmula:

$$\text{Taxa de Colonização} = \frac{\text{Número total de produção} \geq 1}{\text{Número total de amostra do teste}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três espécies avaliadas apresentaram diferenças quanto à frequência de fungos isolados, entre espécies e partes vegetativas como mostra a tabela 1. A maior taxa de colonização total foi observada em *C. spicatus* com 37,24 %.

Foram identificados 19 gêneros de fungos, com maior ocorrência de gêneros em *C. spicatus* com 16, seguido de *A. triplinervis* com 12 e *S. cayennensis* com 10, de acordo com Tabela 1 (anexo 1). Os gêneros fúngicos foram bastante representativos em folhas e raízes de *C. spicatus* em relação as demais espécies. Para Verma et al. (2007); Gazis & Chaverri (2010) as mudanças nas comunidades endofíticas, tanto na composição de espécies e abundância ocorrem em virtude da localização (ambiente), o tecido de origem e as condições em torno da planta.

Um dos fatores que pode justificar tal resultado pode estar relacionado com o habitat e o ambiente de coleta de cada espécie. A espécie *C. spicatus* foi coletada de um ambiente mais úmido em relação às outras duas espécies, fator este que pode ter favorecido o desenvolvimento dos fungos. Ren et al. (2011) ao avaliarem *Achnatherum sibiricum* quanto aos benefícios da associação simbiótica com fungos endofíticos observaram que quando reduzida a quantidade de água, os níveis de infecção são menores, mesmo com a disponibilização de nutrientes. De acordo com Costa Neto (2009) a frequência e composição de espécies das comunidades microbianas são dependentes das interações entre os fatores bióticos e abióticos inerentes aos seus habitats, uma vez que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico.

Tabela 1: Frequência (%) de fungos endofíticos em *Costus spicatus*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Ayapana triplinervis*, isolados de diferentes partes vegetativas.

Fungos	Espécies								
	<i>Costus spicatus</i>			<i>Stachytarpheta cayennensis</i>			<i>Ayapana triplinervis</i>		
	Raiz	Caule	Folha	Raiz	Caule	Folhas	Raiz	Caule	Folha
<i>Aspergillus</i>	23,10	23,77	18,88	18,72	30,41	32,84	13,27	25,94	25,48
<i>Beuveria</i>	-	-	6,34	-	-	0,59	-	-	-
<i>Fusarium</i>	15,51	1,96	8,31	4,87	-	0,59	19,39	-	11,29
<i>Phacelomyces</i>	1,98	7,84	1,98	27,18	7,06	5,92	-	2,83	8,06
<i>Penicillium</i>	1,49	2,45	13,90	3,59	18,98	18,05	3,57	12,26	20,00
<i>Pestalotia</i>	-	-	2,87	-	-	-	-	-	4,52
	28,22	26,72	9,97	26,92	34,55	22,49	36,22	41,04	-
<i>Trichoderma</i>									
<i>Colletotrichum</i>	-	-	0,60	-	-	6,51		3,30	
<i>Scopulariopsis</i>	-	-	-	-	-	1,48	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	4,95	-	2,87	-	-	-	-	-	-
<i>Aureobasidium</i>	-	8,5	20,6	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora</i>	3,63	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stachybotrys</i>	2,15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton</i>	1,32	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis</i>	-	--	-	-	-	-		5,56	
<i>Curvularia</i>	-	-	-	-	-	-	-	2,36	5,81
<i>Acremonium</i>	4,79	-	1,66	10,77	-	-	-	6,60	16,45
<i>Memnoniella</i>	3,30	7,11	-	-	-	-	9,18	-	-
Micélio esteril*	9,57	21,57	7,55	7,95	9,0	11,54	18,37	-	8,39
Total	12	8	12	7	5	10	6	8	8

A frequência total dos fungos endofíticos nas partes vegetativas foi expressiva em folhas de *C. spicatus* (39,49%); caule de *S. cayennensis* com (36,08%) e em raízes de *C. spicatus* (36,15%). A taxa de colonização fúngica foi relativamente maior nas superfícies foliares do que nas demais partes vegetativas. De acordo com Gaitán (2006) fungos endofíticos estabelecem com seus hospedeiros relações simbióticas complexas, e nas zonas temperadas como nas tropicais há especificidade dos endossimbiontes por tecidos vegetais particulares.

A maior colonização dos endofíticos em folhas *C. spicatus* em relação às demais espécies pode estar relacionado com as características morfoanatômicas da espécie, *C. spicatus* possui apenas tricoma tector (Paes et al., 2009) o qual

apresenta apenas função mecânica e não de defesa química. Calo et al. (2006) descrevem a relação existente entre o quantitativo de tricomas e o processo de infecção fungica nas superfícies foliares de *Arabidopsis* mutantes, e indicam que a maior ou menor incidência de tricomas tectores pode facilitar o processo de adesão de esporos e hifas conseqüentemente influenciando nas taxas de colonização da planta hospedeira. Bailey et al. (2009) descrevem o estabelecimento de associações simbióticas do gênero *Trichoderma* com tricomas presentes em superfícies vegetais de *Theobroma cacao*.

Os gêneros fúngicos que apresentaram maior representatividade nas partes vegetativas das três espécies vegetais avaliadas foram *Aspergillus*, *Phacelomyces*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Tabela 1), não demonstrando especificidade de ocorrência por determinados tecidos sendo denominados de generalistas. Trabalhos realizados com *Eremanthus erythopappus* (DC.) McLeish (Asteraceae) por Magalhães et. al 2008 diferem dos resultados encontrados com relação ao gênero *Aspergillus* no qual foi classificado como especialista.

O gênero *Trichoderma* teve maior freqüência nas três espécies vegetais estudadas, colonizando diferentes partes vegetativas. O mesmo foi observado por Gazis e Chaverri (2010).

A ocorrência de gêneros como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Trichoderma*, *Curvularia* também são descritos como endófitos em outras espécies vegetais para a família Asteraceae (Magalhães et al., 2008). Estudos realizados com plantas medicinais por Naik et al. (2008), descreveram o isolamento de fungos endofíticos em várias plantas e descreveram a presença do *Colletrotrichum* para a família Verbenaceae, resultado este que corresponde aos encontrados no isolamento fúngico de *S. cayennensis*.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que as espécies medicinais apresentam uma microbiota fúngica diversificada que pode variar entre espécies de plantas e entre partes vegetativas específicas. Tais informações constituem subsídios ao desenvolvimento de pesquisas que incluam o uso dos fungos endofíticos como possíveis potenciais biotecnológicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), ao Laboratório de Botânica Agroflorestal (LABAF/UFAM), à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical /UFAM.

REFERÊNCIAS

ABDOU, R. et al. Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.711, n.1, p.110-116, 2010.

ARNOLD, A.E; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v.88, n.3, p.541–549, 2007.

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic **Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.15-16, 2000.

BAILEY, B. A. et al. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. **Micological research**, v.113, n.12,p.1365-1376. 2009.

BARNET, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 218p.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 2003. 322p.

BOORHEM, R.L. et al. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil Ltda,1999. 416p.

CALO, L. et al. Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3-glucanase. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.14, p.3911–3920, 2006.

COSTA-NETO; P.Q. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke) 2009. 108p. Tese (Doutorado - Área de concentração em Biotecnologia). Setor de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

GAITÁN, M. A. G. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. **Acta I.Colomb.**vol.11, n.1. 2006.

GAZIS R, CHAVERRI P, Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v, 3, p, 240-254. 2010.

JI, Y. et al. Taxol-producing fungi: A new approach to industrial production of taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.22, n.1, p.1-6, 2006.

MACÍAS-RUBALCAVA, M.L. et al. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. **Phytochemistry**, v.69, n.5, p.1185-1196, 2008.

MAGALHÃES, W.C.S. et al. Diversidade de fungos endofíticos em *Candeia eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, v.14, n.3, p.267-273, 2008.

NAIK, B. S. et al. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India Original Research Article **Fungal Ecology**, v.1, n. 2-3 2008, p. 89-93. 2008

PAES, L.S. et al. Estudo das estrutura foliar de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (pobrevelho) numa perspectiva anatômica e fitoquímica. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA 4.,

2009, Belém. Anais do Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CD-ROM). Belém: IFPA, 2009.

PEREIRA, J. O. Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. 1993. 102p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. ESALQ, Piracicaba.

RAJASEKARAN, A. et al. Haemostatic effect of fresh juice and methanolic extract of leaves rat model *Eupatorium ayapana*. **International Journal of Biological and Medical Research**, v.1, n.3, p.85-87, 2010.

REN, A. et al. Benefits of a symbiotic association with endophytic fungi are subject to water and nutrient availability in *Achnatherum sibiricum*. **Plant and soil**, v.346, n.2 p.363-373, 2011.

SALGUEIRO, J.E. Usos e saberes: plantas medicinais no Alentejo e outros produtos naturais. 1.ed. Lisboa: Marca, 2004. 422p.

SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, v.34, n.2, p.185–195, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecção de endófitos microbianos e seus produtos naturais. **Microbiology Molecular Biology**, v.67, p.491-502, 2003.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecte with pycnidia acervuli and stromata**. 1.ed. London: Cabi Publishing, 1980. 696p.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. "Fungal endophytes and bioprospecting". **Fungal Biology Reviews**, v.23, n.1-2, p. 9-19, 2009.

TAKAHASHI, J.A., LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1807-1813, 2008.

VERMA VC, et al. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stems tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, p.119-125. 2007.

YUAN, Z. et. al. Identity, Diversity, and Molecular Phylogeny of the Endophytic Mycobiota in the Roots of Rare Wild Rice (*Oryza granulata*) from a Nature Reserve in Yunnan, China: Appl. **Environmental Microbiology**, v.76, n. 5, p. 1642- 1652, 2010.

WANG B., et al. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. **Mycological Research**, v. 111, n. 3, p.347-354, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A abordagem multidisciplinar deste estudo, através das análises de aspectos estruturais, histoquímicos e fitoquímicos realizadas nas espécies *Costus spicatus* (pobrevelho), *Stachytarpheta cayennensis* (gervão), *Ayapana triplinervis* (japana) utilizadas popularmente como recursos medicinais, possibilitaram as seguintes conclusões:

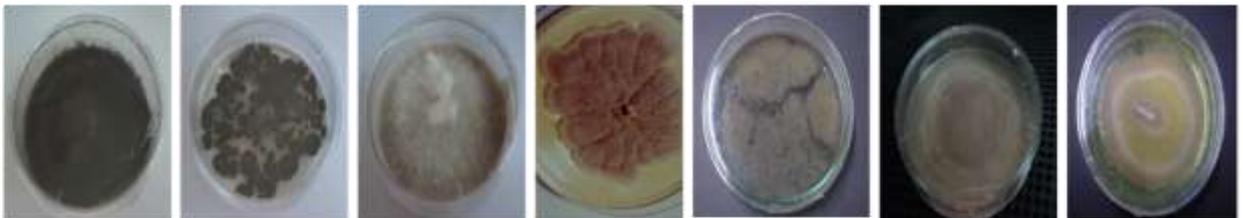
A prospecção química indicou que as três espécies avaliadas produzem polifenóis saponinas e alcaloides. Estas categorias químicas possibilitam o isolamento de substâncias com ações antibióticas com possíveis aplicações na farmacologia, agronomia e fitoquímica.

Os aspectos estruturais identificados nas espécies vegetais tais como: canais secretores, tricomas glandulares e tectores, além de nectários extraflorais constituem informações relevantes para compreender a forma de armazenamento dos compostos secundários nos tecidos vegetais constituindo informações relevantes para a caracterização taxonômica e fisiológica.

A avaliação micológica identificou a colonização dos fungos endofíticos em diferentes partes vegetativas. Os dados revelam que há uma relação de especificidade de determinados fungos por órgãos e que existe diferenças significativas nas taxa de colonização fúngicas entre as espécies, provavelmente em virtude das diferenças estruturais (estômatos, tricomas tectores, tricomas glandulares, etc.) peculiares a cada espécie vegetal.

Entre as três espécies vegetais *C.spicatus* apresentou uma organização estrutural sem estruturas secretoras internas, com tricomas tectores simples, e os mesmos componentes químicos presentes nas demais espécies, no entanto, a taxa de colonização de fungos endofíticos foi bastante significativa. Estes resultados reforçam a importância dos aspectos estruturais e de reserva no processo de interação das plantas e fungos.

ANEXOS

*Tricoderma**Fusarium**Pestalotia**Aureobasidium**Paecilomyces**Acremonium**Stachybotrys**Penicillium**Cladosporium**Aspergillus**Colletotrichum**Curvularia**Nigrospora**Memnoniella**Beuveria**Scopulariopsis**Monascus**Botrytis**Trichophyton*

Anexo 1. Gêneros fúngicos isolados de *Stachytarpheta cayennensis*, *Aypana triplinervis* e de *Costus spicatus*.