

Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae)¹

Makeli Garibotti Lusa^{2,4} e Cleusa Bona³

Recebido em 19/04/2010. Aceito em 7/06/2011

RESUMO

(Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae)). *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. é uma planta herbácea, que ocorre preferivelmente em locais úmidos. Dentre outras espécies do gênero, esta se destaca pelo grande potencial químico e emprego frequente na medicina popular. Neste estudo, descrevem-se aspectos morfológicos, a anatomia e as características histoquímicas dos órgãos vegetativos, na fase de desenvolvimento em que a espécie é comercializada. A partir de plantas adultas, foram coletadas amostras de raiz, caule e folhas. Esse material foi processado para análise anatômica e histoquímica em microscopia de luz e para análise morfológica, em microscopia eletrônica de varredura. Considerações morfoanatômicas importantes foram acrescentadas para *C. carthagenensis*, tais como: a ocorrência de felema aerenquimatoso com camadas suberificadas; a identificação dos tipos de tricomas ocorrentes nos órgãos vegetativos; e a caracterização do tricoma secretor, bem como do material secretado. Os grupos de metabólitos secundários presentes nos tecidos da raiz, do caule e da folha de *C. carthagenensis* que apresentaram reação histoquímica mais intensa foram: proantocianidinas, compostos fenólicos, polissacarídeos ácidos (especialmente mucilagem) e lipídios totais.

Palavras-chave: *Cuphea*, Lythraceae, felema aerenquimatoso, sete-sangrias, tricomas secretores, tricomas tectores

ABSTRACT

(Morphological, anatomical and histochemical characterization of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. (Lythraceae)). *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. is an herb, which occurs preferably in wet places. Amongst other species of the genus, *C. carthagenensis* is distinguished for its great chemical potential and frequent use in popular medicine. In this study the morphological and anatomical structures were identified, as well as the histochemical characterization was done. Samples of root, stem and leaves were collected from adult plants. This material was processed for anatomical and histochemical analysis in light microscopy and for morphological analysis, in scanning electron microscopy. Important morphological and anatomical considerations were added for *C. carthagenensis*, such as: the occurrence of aerenchymatous phellem with suberized layers; the types of trichomes present in the vegetative organs, the characterization of secretory trichomes, as well as the secreted substances. The groups of secondary metabolites presents in the root, stem and leaf of *C. carthagenensis* with more intense histochemical reaction were: proanthocyanidins, phenolic compounds, acids polysaccharides (mucilage especially) and lipids.

Key words: aerenchymatous phellem, glandular trichomes, nonglandular trichomes, sete-sangrias

Introdução

Algumas espécies de *Cuphea*, conhecidas popularmente no Brasil por sete-sangrias, são utilizadas para fins terapêuticos como diaforéticas, diuréticas, laxativas e, especialmente, no controle da hipertensão arterial e prevenção da arteriosclerose. Para os fins terapêuticos, são empregadas todas as partes da planta adulta (Lorenzi & Matos 2002). O referido gênero constitui-se num grande potencial para as indústrias química, alimentícia e farmacêutica, pois as espécies apresentam ácidos graxos de grande importância (Amarasinghe *et al.* 1991).

Dentre outras espécies, *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. se destaca pelo emprego frequente na medicina popular, com efeitos terapêuticos investigados nos últimos anos. Schuldt *et al.* (2000) observaram o relaxamento da aorta torácica em ratos, resultante da utilização do extrato butanólico das partes aéreas de *C. carthagenensis* e consideraram a espécie como benéfica no tratamento e na prevenção de doenças cardiovasculares. Schuldt *et al.* (2004) constataram a atividade antioxidante das folhas de *C. carthagenensis*, indicando esta como atuante no controle da hipertensão arterial e no tratamento e na prevenção da arteriosclerose. Os efeitos

¹ Parte da dissertação de Mestrado da primeira Autora

² Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Campinas, SP, Brasil

³ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Botânica, Curitiba, PR, Brasil

⁴ Autor para correspondência: makelilus@yahoo.com.br

terapêuticos da espécie incluem: atividade antibiótica sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Duarte *et al.* 2002), redução dos níveis de colesterol em ratos (Biavatti *et al.* 2004) e atividade antiviral sobre o Herpes simplex vírus tipo I (HSV-1) (Andrighetti-Fröhner *et al.* 2005). Dessa maneira, *C. carthagenensis* representa uma importante fonte de compostos ativos, com grande potencial terapêutico.

Cuphea carthagenensis é uma planta herbácea, anual, anfibia, de crescimento espontâneo, que ocorre preferivelmente em locais úmidos, habitando campos, bordos de mata, beiras de estradas, beiras de rios e locais alagados. De acordo com Lorenzi & Matos (2002), a espécie é nativa de toda a América do Sul e mede 20 a 50 cm; seu caule é avermelhado, totalmente coberto por tricomas; as folhas são simples e opostas, e as flores, lilases, dispostas nas axilas foliares.

As espécies de *Cuphea* exibem a maior diversidade de tipos de tricomas dentre os gêneros de Lythraceae. Estes apêndices podem estar distribuídos nas folhas, nos caules e nas flores, sendo que todas as espécies apresentam ao menos um tipo. Aliados a outros caracteres, os tricomas apresentam grande importância taxonômica na identificação das espécies de *Cuphea* (Amarasinghe *et al.* 1991).

A caracterização morfoanatômica de *Cuphea carthagenensis* é importante para o reconhecimento da espécie e é fundamental para subsidiar o controle de qualidade do material rasurado dessa espécie, que chega à indústria farmacêutica. A identificação histoquímica da espécie pode se constituir num método rápido e de menor custo para avaliação presuntiva da sua composição química. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi identificar os aspectos morfológicos, anatômicos e as características histoquímicas dos órgãos vegetativos de *C. carthagenensis*, na fase de desenvolvimento em que a espécie é comercializada.

Material e métodos

As coletas do material botânico de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. foram realizadas a partir de dez matrizes em estágio reprodutivo, em janeiro de 2008 e janeiro de 2009, no município de Concórdia, Estado de Santa Catarina (27°17'27" S e 52°01'17" W), a 520 m de altitude. As exsicatas foram enviadas para especialista, para a confirmação da espécie e estão tombadas sob o registro CEN 68528 (Herbário CENARGEN).

Para análise morfoanatômica, amostras de raiz (próximo ao ápice, na região mediana e próximo ao colo), de caule (do primeiro ao quinto nós) e de folhas adultas (a partir do quinto nó, na porção mediana da lâmina) foram fixadas em FAA 50 (formol, ácido acético glacial e etanol 50% na proporção de 1:1:18) (Johansen 1940) ou em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump 1976) e, posteriormente, conservadas em etanol 70%.

Para análise morfológica dos tricomas, estômatos e cutícula foram realizadas análises da superfície da folha e do caule, em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As amostras de folhas jovens e caules, do primeiro ao quarto nós previamente fixadas em FAA 50, desidratadas em série etílica até etanol absoluto (Johansen 1940) e secas via ponto crítico com CO₂, em equipamento BAL-TEC CPD 030 – Critical Point Dryer. Essas amostras foram fixadas em suporte metálico com fita adesiva de cobre, metalizadas com ouro, em equipamento SCD 030 Balzers Union FL 9496. As observações e eletromicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM - 6360LV. Para a tipificação dos tricomas empregou-se a terminologia proposta por Amarasinghe *et al.* (1991).

Para análise anatômica, foram montadas lâminas semipermanentes e permanentes. As lâminas semipermanentes foram confeccionadas segundo técnicas convencionais de corte à mão livre. A coloração foi realizada com Azul de Toluidina (O'Brien 1964), ou Azul de Astra e fucsina básica (Alves de Brito & Alquini 1996). As lâminas foram, em seguida, montadas em gelatina glicerínada (Kaiser 1880) e vedadas com esmalte incolor. As amostras para confecção de lâminas permanentes foram incluídas em historresina, seccionadas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas, coradas com Azul de Toluidina (O'Brien 1964) e montadas em resina sintética (Permount®).

Testes histoquímicos foram realizados nas raízes (próximo ao ápice, em início de crescimento secundário e na região mediana), nos caules (do primeiro ao quinto nós) e nas folhas (a partir do quinto nó, na porção mediana). Para tais análises utilizou-se material fresco ou fixado, seccionado a mão livre ou em micrótomo, quando incluído em historresina. Para detecção de lipídios totais, utilizou-se Sudan III (Pearse 1980); para esteroides, tricloreto de antimônio (Hardman & Sofowora 1972; Mace *et al.* 1974); para lactonas sesquiterpênicas, ácido sulfúrico (Geissman & Griffin 1971); para compostos fenólicos gerais, cloreto férrico (Johansen 1940); para taninos, vanilina clorídrica (McManus 1948); para proantocianidinas (taninos condensados), vanilina sulfúrica - vanilina a 2% em ácido sulfúrico a 50%, adaptado de Price *et al.* (1978) e de Scalbert (1992); para alcaloides, reagente de Wagner (Furr & Mahlberg 1981); para polissacarídeos neutros, PAS - Ácido Periódico/Reagente de Schiff (McManus 1948); e para polissacarídeos ácidos (inclusive substâncias pécticas), Vermelho de Rutênio (Johansen 1940). Seções controle foram realizadas simultaneamente aos testes histoquímicos, conforme procedimento padrão. Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e das secreções, foram montadas e observadas seções sem tratamento.

As análises microscópicas e registros fotográficos foram realizados em microscópio fotônico ou estereoscópico da marca ZEISS® (Axiolab LR 66239C) com câmera fotográfica (Sony® Cyber-shot DSC-P200) acoplada.

Resultados

Raiz

Em início de crescimento secundário, as raízes apresentam epiderme e exoderme unisseriadas (sendo a exoderme com

paredes pouco espessadas). As células corticais, alinhadas radialmente, se separam no mesmo sentido radial e sofrem colapso, originando lacunas de aerênquima. A endoderme é evidente e apresenta células com paredes delgadas (Fig. 1). Internamente à endoderme, o cilindro vascular é composto por periciclo descontínuo, assim os elementos de tubo crivado podem estar em contato direto com a endoderme. Os elementos de vaso do xilema são envoltos por fibras de natureza gelatinosa (Fig. 1). Com o crescimento secundário, a epiderme é eliminada e a exoderme passa a ser a camada mais externa. A endoderme divide-se, anticlinalmente, para acompanhar o aumento em espessura do órgão (Fig. 2). Junto ao aerênquima, a endoderme se mantém funcional, mesmo após a instalação do felogênio (na região pericíclica) e a formação de várias camadas de felema (Fig. 3). A periderme é formada pelo felema aerenquimatoso, felogênio e uma camada de feloderme (Fig. 3). O felema possui camadas unisseriadas de células achatadas, justapostas, com paredes suberizadas, alternadas por três ou quatro camadas de células não suberizadas, dispostas frouxamente, delimitando espaços intercelulares conspícuos (Fig. 3-4). O floema secundário é contínuo por todo o cilindro vascular. O xilema secundário é composto de vasos de diâmetros variados, predominantemente solitários ou em séries radiais, raios parenquimáticos estreitos (Fig. 4) e muitas fibras – libriformes gelatinosas na raiz em crescimento (Fig. 2) e libriformes não-gelatinosas na raiz madura (Fig. 4).

Os testes histoquímicos (Tab. 1) evidenciaram na raiz a presença de: lipídios no córtex e floema e células com paredes suberizadas no felema; lactonas sesquiterpênicas no conteúdo dos vasos do xilema; compostos fenólicos gerais no córtex, felema, floema e nos raios parenquimáticos do xilema; proantocianidinas em idioblastos do córtex e felema e no conteúdo dos vasos e nos raios parenquimáticos do xilema; e polissacarídeos neutros nas células achatadas do felema aerenquimatoso e na endoderme.

Caule

A vista frontal da epiderme evidencia células retangulares alongadas, exceto na base dos tricomas secretores onde mostram-se globosas. Os tricomas são de três tipos: tipo 1 - tricomas secretores longos, multicelulares, multisseriados, com base bulbosa expandida (Fig. 5-6); tipo 2c - tricomas tectores curtos, unicelulares, espiniformes, com paredes com ornamentação verrucosa (Fig. 7); e tipo 4 - tricomas tectores curtos, com uma a três células, com paredes não ornamentadas (Fig. 7). Os tricomas tectores, ornamentados e não ornamentados, apresentam-se mais concentrados em algumas regiões, formando faixas descontínuas sobre a superfície caulinar (Fig. 6). Os tricomas secretores possuem na sua base expandida, células secretoras com citoplasma denso e vacúolos pequenos (Fig. 8). A camada externa que envolve as células secretoras se estende formando um estreitamento ('gargalo') multicelular que se afila em direção ao ápice. O exsudato tem aspecto resinoso, com brilho intenso

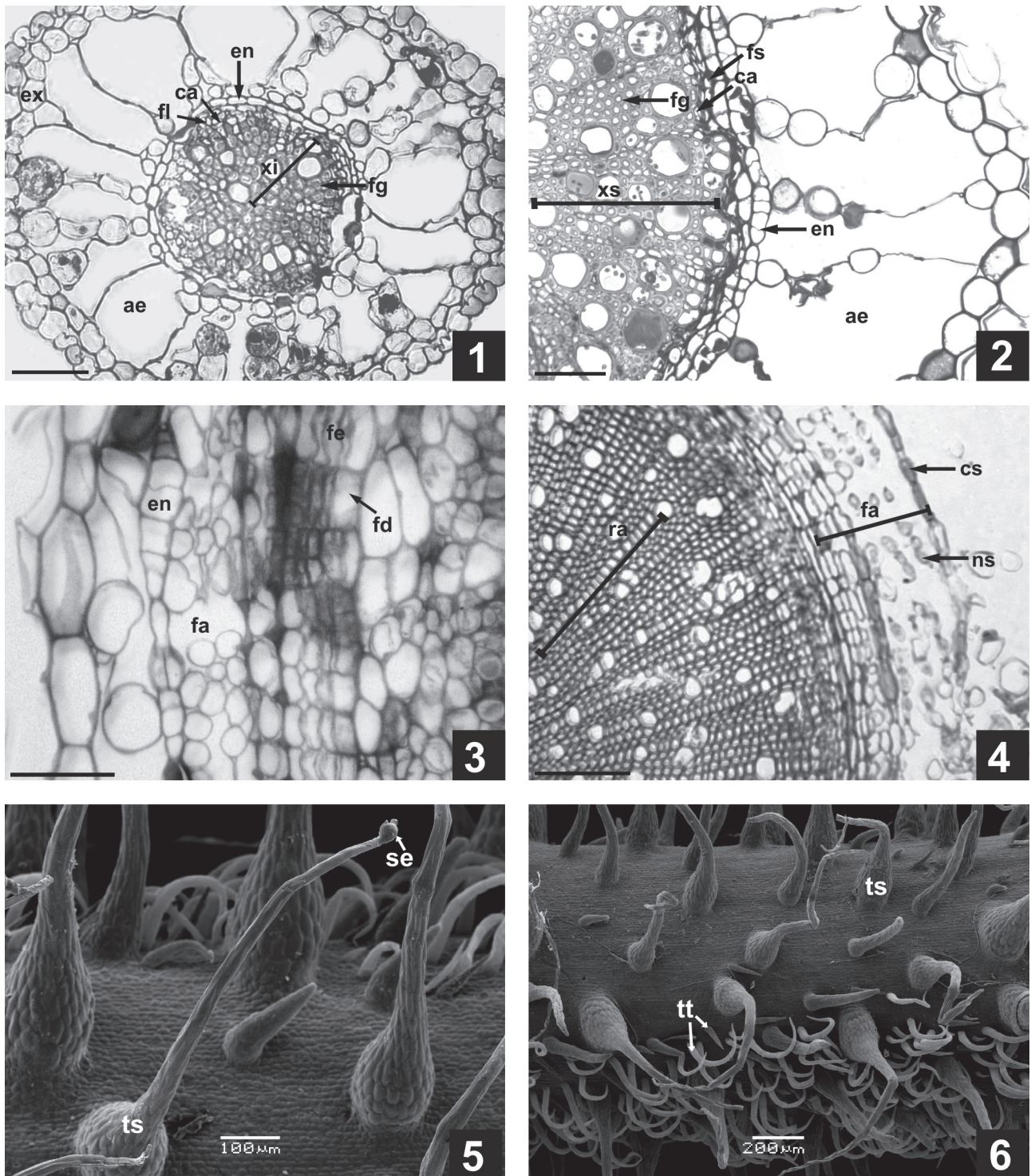
na presença de luz e com consistência pegajosa. Quando observado sem a secreção, o tricoma secretor se assemelha a um tricoma tector (Fig. 6).

A epiderme do caule é unisseriada (Fig. 9-10). O córtex é parenquimático, com as primeiras camadas clorenquimáticas (Fig. 9). Algumas regiões do caule podem conter células epidérmicas e corticais com pigmentos avermelhados, provavelmente antocianinas. As camadas mais internas podem ou não apresentar células colapsadas formando aerênquima (Fig. 9-10). O felogênio instala-se no periciclo (Fig. 10). No caule em crescimento secundário, ocorre uma faixa contínua de floema secundário externo, seguida interiormente pelo câmbio, xilema e floema interno (Fig. 9-10). Podem ocorrer fibras xilemáticas libriformes gelatinosas, sendo mais comuns aquelas libriformes não gelatinosas. A medula é parenquimática e pode formar lacunas de aerênquima (Fig. 10). Além disso, podem ocorrer cristais em formato de drusas de forma individual ou agrupados, geralmente em idioblastos com conteúdo péctico.

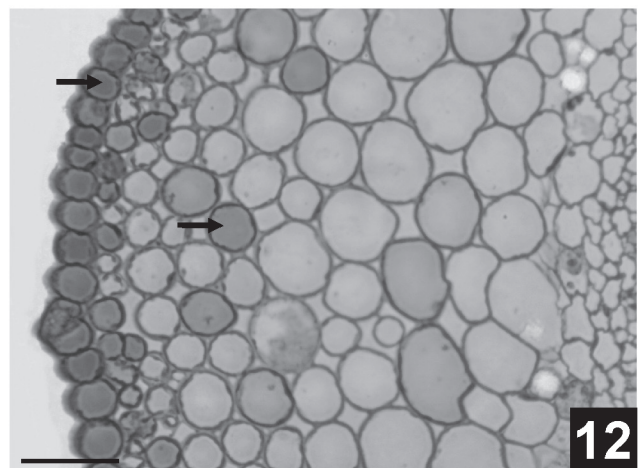
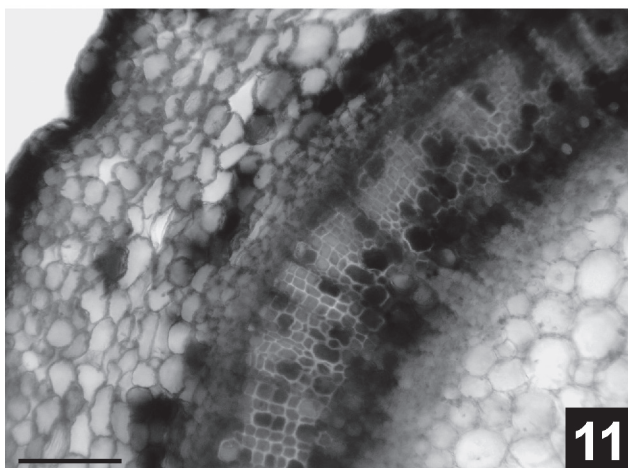
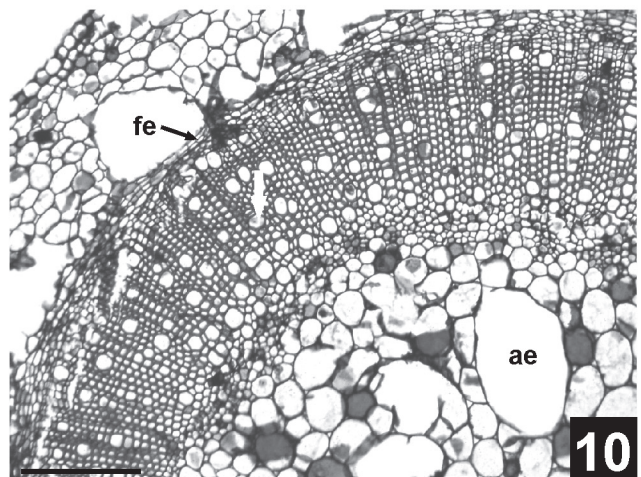
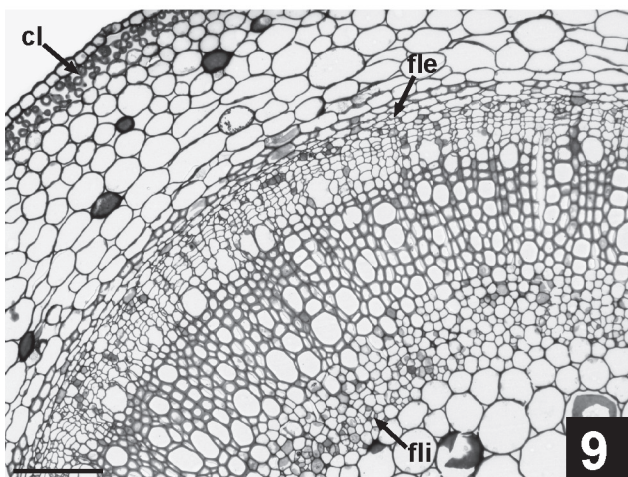
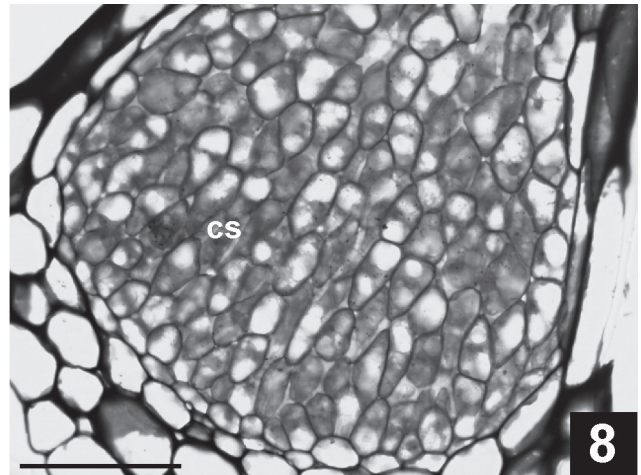
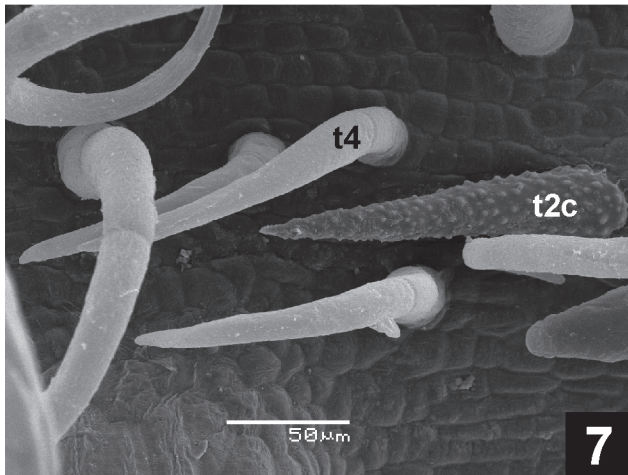
No caule, os testes histoquímicos (Tab. 1) evidenciaram a presença de: lipídios no exsudato dos tricomas secretores e nas células secretoras da base do tricoma; lactonas sesquiterpênicas no conteúdo dos vasos do xilema e nas células secretoras do tricoma; compostos fenólicos na epiderme, nas camadas mais externas e internas do córtex, no floema, no conteúdo dos vasos do xilema (Fig. 11) e nas células secretoras da base dos tricomas; proantocianidinas no córtex e por todo o sistema vascular do caule, na secreção e nas células secretoras dos tricomas; polissacarídeos neutros em idioblastos do córtex externo e da epiderme (Fig. 12) e nas células secretoras dos tricomas; e polissacarídeos ácidos (substâncias pécticas) nos idioblastos cristalíferos, especialmente na medula do caule, além da presença de tais substâncias nas paredes celulares.

Folha

Em vista frontal, as células epidérmicas possuem paredes anticlinalis sinuosas (Fig. 13) em ambas as superfícies, com estrias epicuticulares mais pronunciadas na face abaxial (Fig. 14-15). Os estômatos são dos tipos diacítico e anomocítico (Fig. 13). Os tricomas estão presentes em ambas as faces, sendo de três tipos: tipo 1 - secretores longos, multicelulares, multisseriados (idênticos àqueles observados no caule), principalmente concentrados sobre as nervuras (Fig. 16); tipo 2a - tectores curtos, unicelulares, espiniformes, com parede com ornamentação verrucosa e oblíquos em relação à base (Fig. 16-18); e tipo 4 - tricomas tectores curtos, com uma a três células, com paredes lisas ou levemente estriadas (Fig. 17). Os tricomas tectores tipo 2a são bem distribuídos por toda a epiderme, mais concentrados nos bordos (Fig. 18) e direcionados ao ápice foliar (Fig. 16-17). Os tricomas tectores do tipo 4 se concentram, especialmente, sobre as nervuras (Fig. 17). A veenação apresenta areolas poligonais, com as nervuras de menor porte terminando livremente na aréola (Fig. 19). Idioblastos



Figuras 1-6. *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. 1 a 4. Raiz em secção transversal. 5 e 6. Caule em vista frontal (MEV). 1. Raiz de segunda ordem evidenciando exoderme (ex), aerênquima (ae), endoderme (en), floema (fl), câmbio vascular (ca) e xilema (xi) com fibras gelatinosas (fg). 2. Raiz em crescimento secundário com aerênquima (ae) desenvolvido, divisões anticlinais na endoderme (en), floema secundário (fs), câmbio vascular (ca) e xilema secundário com fibras gelatinosas (fg). 3 e 4. Raízes em crescimento secundário avançado. Em 3, observar formação do felema aerênquimatoso (fa) a partir do felogênio (fe), a feloderme (fd) e a endoderme (en). Em 4, notar células suberizadas (cs) e não suberizadas (ns) alternadas no felema (fa) e raio parenquimático (ra) no xilema secundário. 5. Superfície caulinar com detalhe da secreção (se) na extremidade do tricoma secretor (ts). 6. Superfície caulinar com tricomas secretores (ts) e faixa descontínua de tricomas tectores (tt). Fig. 1, 2 e 3, escala = 50 µm. Fig. 4, escala = 150 µm.



Figuras 7-12. Caule de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. 7. Epiderme com tricomas tectores, tipo 2c (t2c) e tipo 4 (t4) (MEV). 8. Secção longitudinal da base do tricoma secretor, evidenciando células secretoras (cs). 9-12. Secções transversais. 9. Vista geral evidenciando camadas clorenquimatosas (cl) no córtex externo. Observar a presença de floema externo (fle) e floema interno (fli). 10. Caule apresentando lacunas de aerênquima (ae) e felogênio (fe) instalando-se junto ao periciclo. 11. Reação positiva para compostos fenólicos na epiderme, no córtex e no sistema vascular. 12. Polissacarídeos neutros (setas) em idioblastos do córtex externo e da epiderme. Fig. 8 e 12, escala = 50 μm. Fig. 9, 10 e 11, escala = 100 μm.

Tabela 1. Caracterização histoquímica dos órgãos e dos tricomas secretores de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. (+) indica resultado positivo e (-), resultado negativo. Número de cruzes indica intensidade de metabólitos no órgão. Tr. secretor = tricoma secretor.

Grupo de Metabólitos	Teste	Folha	Caule	Raiz	Tr. secretor
Lipídios totais	Sudan III	+	+	++	++
Esteroides	Tricloreto de Antimônio	-	-	-	-
Lactonas Sesquiterpênicas	Ácido sulfúrico	+	+	+	+
Compostos fenólicos gerais	Cloreto Férrico	++	++	+++	+
Taninos	Vanilina Clorídrica	-	-	-	-
Proantocianidinas (Taninos condensados)	Vanilina Sulfúrica	++	+++	++	+++
Alcaloides	Reagente de Wagner	-	-	-	-
Polissacarídeos neutros	PAS	+	+	+	++
Polissacarídeos ácidos (substâncias pécticas)	Vermelho de Rutênio	+++	++	+	+

contendo drusas estão dispersos por todo o limbo (Fig. 19).

A epiderme é unisseriada, com células que contém mucilagem na face periclinal externa da parede (Fig. 20). As células epidérmicas são, em geral, maiores na superfície adaxial. A folha é anfi-hipoestomática e os estômatos se encontram, geralmente, no mesmo nível das demais células epidérmicas. O mesofilo é composto, normalmente, por uma camada de parênquima clorofiliano paliádico, podendo ocorrer também duas camadas; o parênquima clorofiliano lacunoso é constituído por cerca de quatro camadas (Fig. 20). Idioblastos contendo drusas são visíveis, especialmente, no parênquima lacunoso. A nervura central apresenta secção transversal plano-convexa e colênquima predominantemente angular, em posição subepidérmica, em ambas as faces (Fig. 21). Esse é seguido, internamente, por parênquima clorofiliano regular e parênquima de preenchimento; o feixe vascular é único, bicolateral e em forma de "C" (Fig. 21). Na margem foliar, o mesofilo, não apresenta modificações, sendo arredondado. O pecíolo, em secção transversal, apresenta estrutura bastante semelhante àquela descrita para a nervura central. No entanto, ocorre a formação de espaços de ar mais evidentes entre as células do parênquima de preenchimento, devido à separação das paredes celulares (Fig. 22).

Na folha, os testes histoquímicos (Tab. 1) evidenciaram a presença de: lipídios nas células secretoras e exsudato dos tricomas secretores; lactonas sesquiterpênicas no conteúdo dos vasos xilemáticos nas células secretoras do tricoma; compostos fenólicos no mesofilo da folha e nas células secretoras dos tricomas; proantocianidinas no mesofilo foliar e nas células secretoras e exsudato dos tricomas secretores; polissacarídeos neutros em idioblastos da epiderme e nas células secretoras dos tricomas; polissacarídeos ácidos (substâncias pécticas) nas paredes celulares e na cutícula da folha, bem como mucilagem na epiderme foliar.

Discussão

Caracterização morfoanatômica

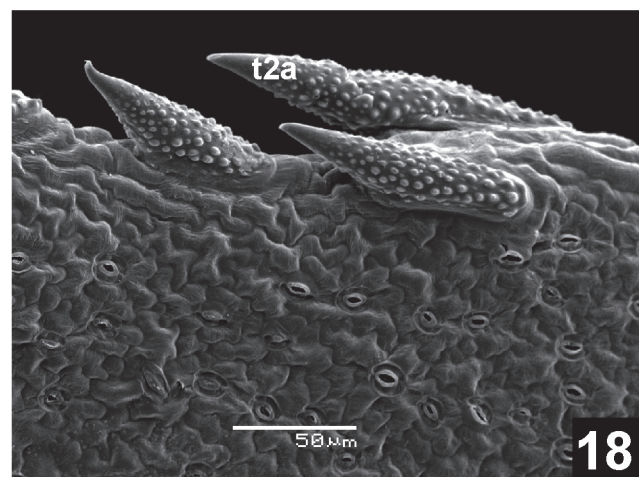
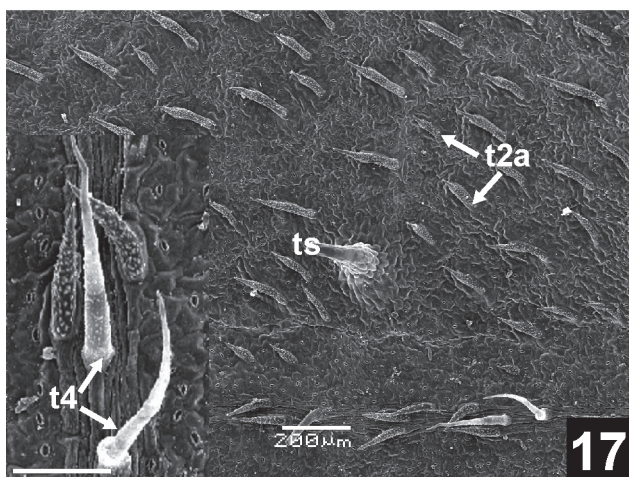
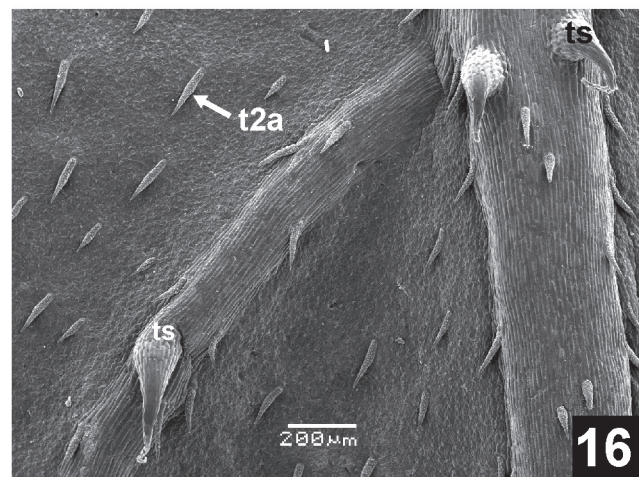
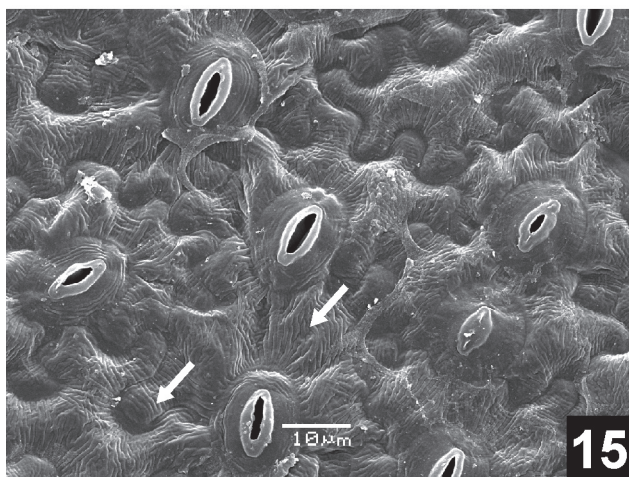
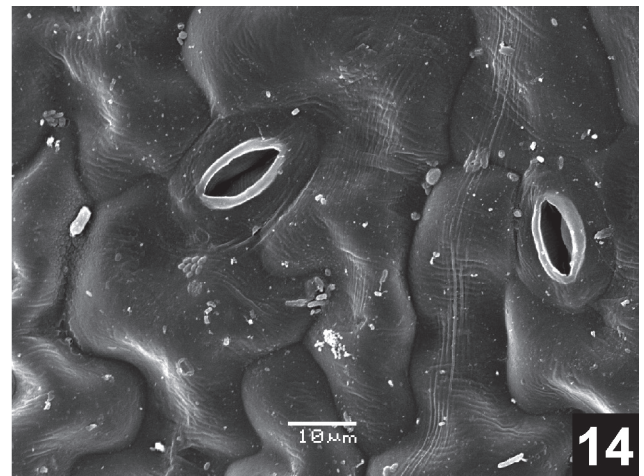
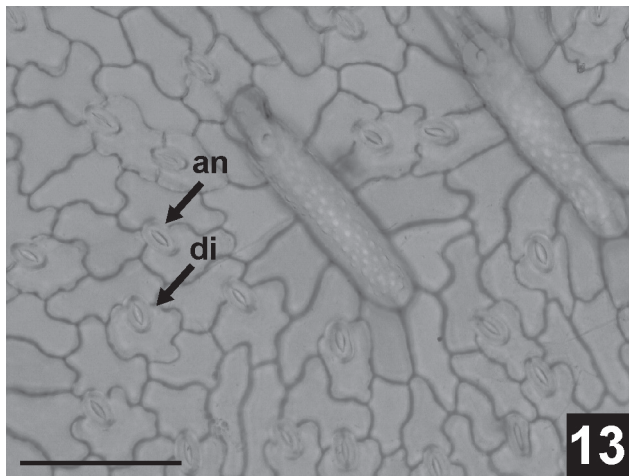
Em relação à estrutura das raízes, a característica mais marcante observada em *Cuphea carthagenensis* foi a formação

de aerênquima de origem primária (córtex) e secundária (felema). Conforme a função clássica atribuída ao aerênquima, as lacunas de ar facilitam a difusão dos gases atmosféricos para as partes submersas da planta (Jackson & Armstrong 1999; Colmer 2003; Voeselek *et al.* 2006). No presente estudo, observou-se que em *C. carthagenensis* a formação desse tecido tem origens distintas: a partir do meristema fundamental na fase de crescimento primário e a partir do felogênio, na fase de crescimento secundário, formando um felema aerenquimatoso. Stevens *et al.* (2002) evidenciaram que o felema aerenquimatoso providencia uma via para trocas gasosas entre raiz e caule em plantas submetidas a ambientes aquáticos portadoras de crescimento secundário, ou seja, plantas que perdem o aerênquima cortical formado primariamente. A presença do aerênquima, tanto na estrutura primária como na secundária, está diretamente relacionada ao hábito anfíbio desta espécie e reforça a habilidade desta em sobreviver em ambientes com variáveis níveis de água.

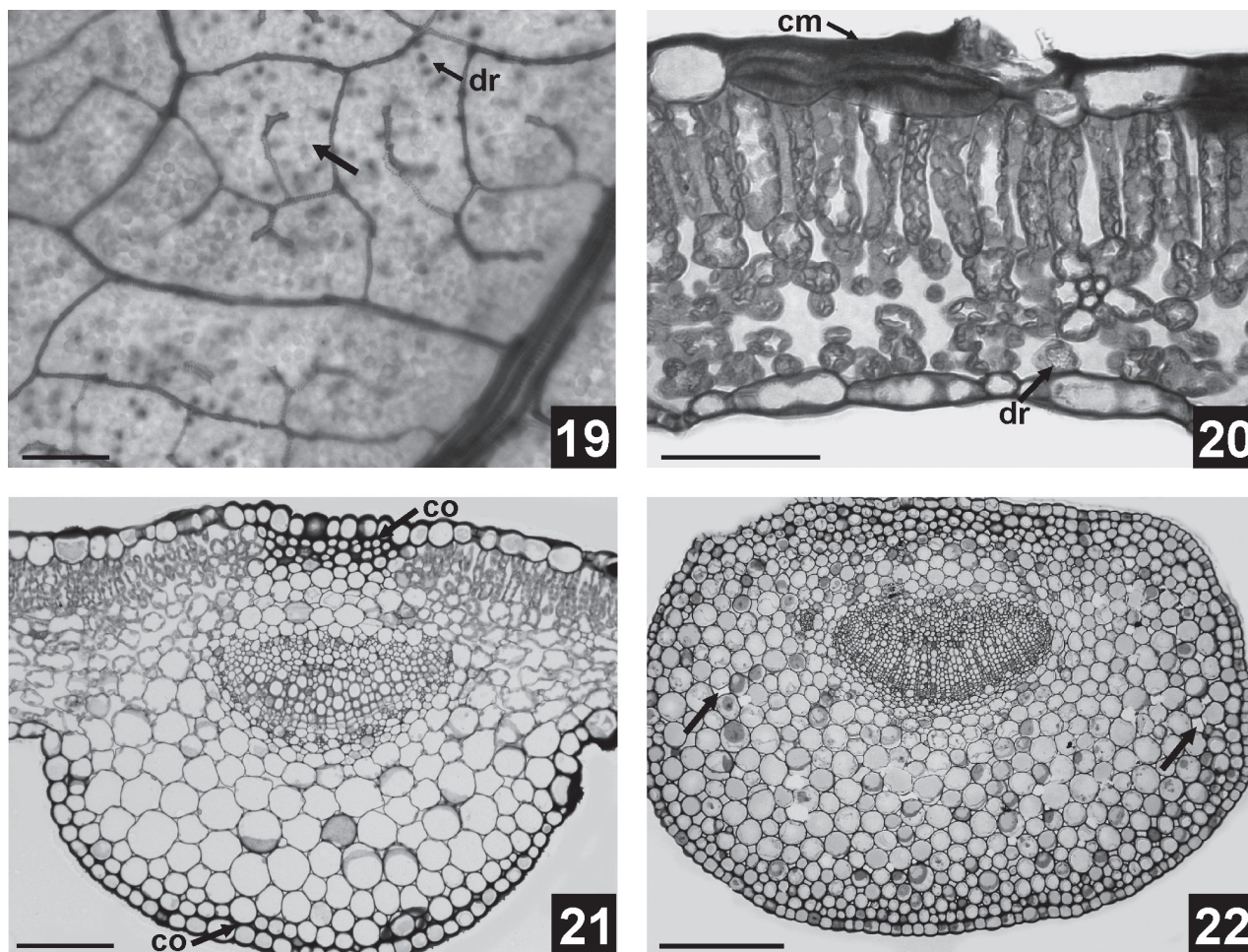
O aerênquima formado no felema é ainda pouco conhecido e investigado, apesar de ter sido descrito já em 1889 por Schenk⁵ (*apud* Lempe *et al.* 2001). De acordo com Stevens *et al.* (2002), isso talvez se deva ao fato de que a maioria das plantas investigadas, portadoras de aerênquima, não possui capacidade de crescimento secundário ou ainda, porque podem ter sido analisadas em estágio jovem.

Em *C. carthagenensis* o felema aerenquimatoso foi observado somente nas raízes. Em caules, o felema não se apresentou aerenquimatoso, provavelmente, em função destes não terem sido expostos a alagamento na área amostral. Conforme as investigações de Lempe *et al.* (2001), a capacidade de formar felema aerenquimatoso pode ser um fenômeno comum para a família Lythraceae. Os autores descrevem a ocorrência do tecido no caule de *Lythrum salicaria* L., *L. hyssopifolia* L., *L. alatum* Pursh., *Decodon verticillatum* (L.) Elliot., *Pleurophora anomala* A. St. Hil. e *Heimia myrticifolia* Cham. e Schlecht. Stevens *et al.* (1997) e Stevens *et al.* (2002) descrevem a presença de felema aerenquimatoso para o caule e também para a raiz de *L. salicaria*. Além de tais espécies, o tecido foi igualmente descrito para três espécies de *Cuphea* por Schenk⁵ (1889 *apud* Lempe *et al.* 2001). A estrutura do

⁵ Schenck, H. Ueber das Aerenchym, ein dem Krok homologes Gewebe bei Sumpfpflanzen. 1889. *Jahrbuecher fuer wissenschaftliche Botanik* 20: 526-574.



Figuras 13-18. Folha de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. 13. Microscopia de luz. 14-18. Eletromicrografias (MEV). 13. Seção paradérmica da superfície adaxial com tricomas tectores e estômatos diacíticos (di) e anomocíticos (an). 14 e 15. Superfície foliar adaxial e abaxial, respectivamente; estrias epicuticulares (setas). 16. Superfície abaxial com tricomas secretores (ts) sobre a nervura e tricomas tectores tipo 2a (t2a). 17. Superfície adaxial com tricomas tectores tipo 2a (t2a) direcionados ao ápice foliar, tricomas do tipo 4 (t4) sobre a nervura (detalhe) e tricomas secretores (ts) sobre o limbo. 18. Bordo foliar com tricomas do tipo 2a (t2a). Fig. 13, escala = 50 μm. Detalhe em 17, escala = 100 μm.



Figuras 19-22. Folha de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. 19. Vista frontal da superfície abaxial evidenciando venação com aréolas poligonais (seta) e nos pontos escuros, drusas (dr) dispersas no limbo. 20. Seção transversal do limbo evidenciando células epidérmicas mucilaginosas (cm) e drusas (dr) dispersas no parênquima clorofiliano lacunoso. 21. Seção transversal da nervura central com feixe bicolateral e colênquima (co) em ambas as faces. 22. Seção transversal do pecíolo evidenciando o parênquima cortical com pequenos espaços intercelulares (setas). Fig. 20 e 21, escala = 50 μ m. Fig. 19 e 22, escala = 100 μ m.

aerênquima secundário de *C. carthagenensis* é semelhante àquela descrita para o felema do caule de *Pleurophora anomala* e *Heimia myrticifolia* (Lempe *et al.* 2001).

A presença de suberina nas células achatadas e justapostas do felema aerênquimatoso de *C. carthagenensis* pode evidenciar uma função semelhante à da endoderme. Stevens *et al.* (1997) e Lempe *et al.* (2001), registraram modificações de parede semelhantes aquelas das células endodermiais, (paredes finas com estrias de Caspary) nas células suberizadas do felema aerênquimatoso de espécies de Lythraceae. Uma função análoga à da endoderme e da exoderme parece imprescindível para plantas submetidas a estresse hídrico, uma vez que a suberificação isola os órgãos, protegendo-os contra a entrada de água, patógenos, microrganismos e da perda de água, solutos e oxigênio para o ambiente externo.

No caule e na folha de *C. carthagenensis* foram registrados quatro tipos de tricomas: tipo 1, 2a, 2c e 4. Amarasinghe *et al.* (1991) relatam sete tipos de tricomas para as espécies do gênero *Cuphea*. Destes, descrevem para *C. carthagenensis* também quatro tipos: tipo 1 – tricomas secretores longos e multisseriados, com base bulbosa expandida; tipo 2a – trico-

mas curtos, unicelulares, com parede espessa “tuberculada” (ornamentada) e oblíquos em relação a uma base expandida; tipo 4 – tricomas unisseriados, com uma a quatro células, com paredes lisas, geralmente delgadas; e tipo 5 – tricomas unicelulares alongados com paredes moderadamente espessadas e “tuberculadas”, normalmente encontrados nos filamentos dos estames. De acordo com as observações realizadas neste estudo, pode-se concordar com os autores quanto à presença dos tricomas dos tipos 1, 2a e 4. Resultados preliminares sobre a morfologia da flor, obtidos por Lusa & Bona (comunicação pessoal), indicam a presença do tricoma do tipo 5 na parede interna do hipanto e nos filetes. Além disso, no presente estudo, foi observado outro tipo de tricoma não descrito para *C. carthagenensis* por Amarasinghe *et al.* (1991). Este corresponde ao tipo 2c (Fig. 7): tricoma unicelular, espiniforme, com parede espessa “tuberculada” ou verrucosa, ereto e sem uma base alargada distinta.

O tricoma do tipo 2c foi aqui registrado somente no caule. Conforme Amarasinghe *et al.* (1991), esse tipo de tricoma é comum em caules e na superfície exterior das flores. Ainda, pela descrição dos autores, o tricoma do

tipo 2a é comum em folhas, enquanto o tipo 4, em caules, o que está de acordo com as observações realizadas neste estudo. Sobre a ocorrência dos tricomas secretores, Amarasinghe *et al.* (1991) relatam que esse tipo aparece em 92% das espécies de *Cuphea*, sendo abundante nas flores, porém menos comum nas folhas. Nesse estudo, o tricoma secretor foi observado na superfície foliar, principalmente sobre as nervuras.

Nos tricomas secretores a secreção é produzida nas células basais e não na porção apical, como sugerem as observações a olho nu e ao estereomicroscópio, uma vez que a secreção se acumula na extremidade do tricoma. A base bulbosa possui células com características tipicamente secretoras. Tal tricoma constitui-se, portanto, numa das estruturas secretoras ocorrentes em *C. carthagenensis*, junto às células mucilaginosas (idioblastos) da epiderme foliar e a idioblastos com diferentes conteúdos, dispersos no caule e na raiz da planta.

As células da região afilada do tricoma secretor, acima da base secretora, reagiram positivamente aos testes para lipídios e proantocianidinas em *C. carthagenensis*. Amarasinghe *et al.* (1991) também registraram a presença de conteúdo denso nessas células. O exsudato em *C. carthagenensis* parece ser produzido e eliminado num processo contínuo, visto que, *in vivo*, os tricomas secretores dispersos por toda a extensão do caule e sobre as folhas são ininterruptamente dotados de gotículas de aspecto resinoso.

O material secretado pelos tricomas pode estar relacionado a funções ecológicas tais como: proteger a planta contra herbívoros e patógenos, reduzir a perda de água pela transpiração cuticular, além de diminuir a temperatura da planta, já que a presença do exsudato pode resultar num aumento da reflectância no órgão em que o tricoma se insere (Dell & McComb 1974; Tattini *et al.* 2000; Monteiro *et al.* 2001).

As células mucilaginosas presentes na epiderme foliar de *C. carthagenensis* são compartilhadas por outras espécies de Lythraceae e consideradas diagnósticas para tal família, dentro de Myrtales (Keating 1984; Little *et al.* 2004). Um dos papéis ecológicos relacionados à mucilagem é o de auxiliar na distensão do órgão em que ocorre (Andreucci *et al.* 2008). A mucilagem, pelas suas características físicas, também pode estar relacionada à retenção de água (Nobel *et al.* 1992; Clifford *et al.* 2002; Chapotin *et al.* 2003). Assim, essa característica pode ser fundamental no hábito anfíbio de *C. carthagenensis*, uma vez que pode atuar com a finalidade de armazenar água e auxiliar na distensão da folha nos momentos de estresse hídrico, já que esta espécie cresce em ambientes aquáticos que podem sofrer rápida redução do nível d'água.

Como características comuns para Lythraceae, as folhas de *C. carthagenensis*, além de células mucilaginosas, possuem o feixe vascular da nervura central em forma de "C", em seção transversal; uma a duas camadas de parênquima paliádico; feixe vascular bicolateral; e drusas no parênquima da nervura central e também no mesofilo (Metcalf & Chalk 1950; Keating 1984; Little *et al.* 2004). Na margem

foliar, o mesofilo, não apresenta modificação, sendo semelhante à maioria das espécies da família (Keating 1984). O tipo de venação foliar em *C. carthagenensis* - com aréolas poligonais e veias de menor porte terminando livremente na aréola - também foi observado para o gênero *Decodon* (J.F.Gmel.) (Little *et al.* 2004), pertencente à Lythraceae. Além dessas características foliares, o caule de *C. carthagenensis* apresenta floema interno, drusas na medula (geralmente ocorrendo agrupadas dentro de idioblastos) e felogênio formado a partir do periciclo, como características comuns à família (Metcalf & Chalk 1950).

Caracterização histoquímica

Na caracterização histoquímica dos órgãos (raiz, caule e folha) e tricomas secretores de *Cuphea carthagenensis* (Tab. 1), verificou-se reação negativa para esteroides, taninos e alcalóides e positiva para substâncias lipofílicas e hidrofílicas, as quais incluem: lipídios, terpenoides (lactonas sesquiterpênicas), compostos fenólicos, proantocianidinas (taninos condensados), polissacarídeos neutros e polissacarídeos ácidos (substâncias pécticas e mucilagem). Duarte *et al.* (2002) relataram o perfil fitoquímico de *C. carthagenensis*, descrevendo a presença de esteroides, saponinas, polifenóis, taninos condensados, proantocianidinas e flavonoides, para as partes aéreas. Andrighetti-Fröner *et al.* (2005) identificaram no perfil fitoquímico dessa espécie compostos polifenólicos e flavonoides, sendo negativa a reação para taninos e saponinas. As saponinas não foram testadas neste estudo, em decorrência da ausência de testes histoquímicos específicos para este grupo químico. Comparando-se os resultados obtidos nos testes histoquímicos, com os perfis fitoquímicos relatados para *C. carthagenensis*, foram detectadas divergências em relação aos grupos químicos: taninos, esteroides e flavonoides. Contudo, não se pode afirmar absolutamente a sua ausência, já que na maioria das vezes tais compostos não são detectáveis na histoquímica, senão por microscopia de fluorescência em luz ultravioleta (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006).

É possível concordar com Duarte *et al.* (2002) quanto à presença de taninos condensados e flavonoides, apesar da negatividade do teste para taninos. As proantocianidinas são consideradas taninos condensados, pelas suas propriedades adstringentes, ou seja, pela capacidade de precipitarem proteínas (Haslam 1998). Além disso, o metabólito também possui estreita relação com a classe dos flavonoides, pois consiste em oligômeros e polímeros de flavonoides (Haslam 1998). Assim, as moléculas de flavonoides se organizam para formar as moléculas de proantocianidinas (Haslam 1998; Rubanza *et al.* 2008), as quais, por sua vez, participarão da formação das antocianinas (pigmentos), junto a outros compostos como açúcares e ácidos (Jaakola *et al.* 2002). Uma pigmentação avermelhada pode ser observada em faixas do caule, bem como em porções da epiderme foliar de *C. carthagenensis*. Pela coincidente histolocalização de

proantocianidinas nessas regiões, acredita-se que estes pigmentos sejam as antocianinas resultantes do processamento metabólico das proantocianidinas.

Os testes histoquímicos permitem evidenciar a localização dos metabólitos nos diferentes órgãos das plantas analisadas. Possibilitando, portanto, identificar quais são as partes do vegetal mais promissoras para a pesquisa química, para o uso medicinal popular e para o desenvolvimento de tecnologias de propagação das plantas de interesse medicinal e econômico. De acordo com a histolocalização realizada, todas as classes de compostos identificadas em *C. carthagenensis* estiveram presentes na raiz, no caule e nas folhas (embora com intensidades diferentes) (Tab. 1), com exceção de polissacarídeos neutros na raiz. Os tricomas secretores dispersos no caule e na folha apresentaram exsudato e células secretoras com constituição química semelhante àquela dos tecidos do mesmo órgão em que ocorrem.

Além da localização presuntiva dos metabólitos, os testes histoquímicos permitiram definir a natureza complexa do conteúdo dos raios parenquimáticos e idioblastos da raiz; do conteúdo dos vasos na raiz e no caule; de idioblastos do córtex e da epiderme do caule; do exsudato resinoso e do conteúdo das células secretoras da base dos tricomas secretores. A natureza complexa de metabólitos foi igualmente observada em tricomas glandulares de *Salvia aurea* L. (Serrato-Valenti *et al.* 1997); em tricomas glandulares de *Salvia officinalis* L. (Corsi & Bottega 1999); no exsudato dos canais secretores e em idioblastos de *Spondias dulcis* (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006); em tricomas glandulares de *Cordia verbenacea* DC. (Ventrella & Marinho 2008); em laticíferos de *Mandevilla atrovioleacea* (Stadelm) Woodson (Lopes *et al.* 2009); e no secretado dos ductos e cavidades de *Casearia decandra* Jacq. (Thadeo *et al.* 2009).

A secreção complexa do tricoma de *C. carthagenensis* tem aparência brilhosa e consistência pegajosa. Tais características podem estar relacionadas à presença de polissacarídeos não celulósicos, evidenciados nos testes histoquímicos e conforme indicado por Ascensão *et al.* (1999) para *Plectranthus ornatus* Codd. Dell & McComb (1974) também observaram a complexidade da resina em *Beyeria viscosa* (Labill.) Miq. (Euphorbiaceae) e afirmam que as resinas das plantas são geralmente uma mistura de terpenoides, flavonoides e substâncias lipídicas. Tais informações sobre resina condizem com os resultados dos testes realizados em *C. carthagenensis*, que indicaram a presença de lipídios e proantocianidinas na secreção dos tricomas e compostos fenólicos e polissacarídeos neutros (não celulósicos) nas células secretoras da base dos tricomas.

Apesar de muito frequente, a complexidade de metabólitos não foi observada como regra geral em *C. carthagenensis*. Nas folhas foram observados polissacarídeos neutros, mucilagem (polissacarídeos ácidos) e proantocianidinas distribuídos independentemente.

Ainda, de acordo com os testes realizados (Tab. 1), os grupos químicos que apresentaram reação histoquímica mais

intensa foram: proantocianidinas, compostos fenólicos, polissacarídeos ácidos (especialmente mucilagem) e lipídios totais. Lee *et al.* (2008) conferem às proantocianidinas e antocianinas presentes nos frutos de cereja (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) efeitos antibacterianos observados sobre a urina humana. Schuldt *et al.* (2004) verificaram atividade antioxidante nos extratos das folhas de *C. carthagenensis* e referem esses efeitos aos compostos fenólicos e flavonoides identificados nas frações extrativas. Duarte *et al.* (2002) associam a atividade antibacteriana de *C. carthagenensis*, observada sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, às classes de metabólitos descritas. Portanto, os metabólitos mais frequentes identificados nos tecidos da raiz, do caule e da folha de *C. carthagenensis* parecem estar relacionados às propriedades terapêuticas condizentes com os usos tradicionais da planta.

Considerações morfoanatômicas importantes foram acrescentadas para *C. carthagenensis*, tais como: a ocorrência de felema aerenquimatoso com camadas suberificadas; a identificação dos tipos de tricomas ocorrentes nos órgãos vegetativos, acrescentando novos dados à literatura já existente; e a caracterização do tricoma secretor, bem como do material secretado. Os dados revelados sobre o felema, as fibras e sobre os tipos de tricomas podem ser úteis na identificação dessa espécie. Novos trabalhos acerca da caracterização dos tipos de tricomas de outras espécies de *Cuphea* podem ser de grande valor no esclarecimento das relações filogenéticas do gênero.

Os grupos de metabólitos secundários presentes nos tecidos da raiz, do caule e da folha de *C. carthagenensis* que apresentaram reação histoquímica mais intensa foram: proantocianidinas, compostos fenólicos, polissacarídeos ácidos e lipídios totais. Tais grupos parecem estar relacionados às propriedades terapêuticas condizentes com os usos tradicionais da planta e são bons indicativos do potencial químico da espécie.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora; à Dra. Taciana Cavalcanti (CENARGEM) pela identificação dos espécimes; ao biólogo Nilson Belém Filho e à Ana Carolina Ghidini, pelos auxílios na microtécnica. Ao Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR, ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Referências bibliográficas

- Alves de Brito, C. J. F.; Alquini, Y. 1996. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 39(4): 949-950.
- Amarasinghe, V.; Graham, S. A.; Graham, A. 1991. Trichome morphology in the genus *Cuphea* (Lythraceae). *Botanical Gazette* 152(1): 77-90.
- Andreucci, A. C.; Ciccarelli, D.; Desideri, I.; Pagni, A. M. 2008. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry. *Annales Botanici Fennici* 45: 11-18.

- Andrighetti-Fröhner, C. R.; Sincero, T. C. M.; da Silva, A. C.; Savi, L. A.; Gaido, C. M.; Bettega, J. M. R.; Mancini, M.; de Almeida, M. T. R.; Barbosa, R. A.; Farias, M. R.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M. O. 2005. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia** **76**: 374–378.
- Ascensão, L.; Mota, L.; Castro, M. M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. **Annals of Botany** **84**: 437–447.
- Biavatti, M. W.; Farias, C.; Curtius, F.; Brasil, L. M.; Hort, S.; Schuster, L.; Leite, S. N.; Prado, S. R. T. 2004. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology** **93** (2/3): 385–389.
- Chapotin, S. M.; Holbrook, N. M.; Morse, S. R.; Gutierrez, M. V. 2003. Water relations of tropical dry forest flowers: pathways for water entry and the role of extracellular polysaccharides. **Plant Cell and Environment** **26**: 623–630.
- Clifford, S. C.; Arndt, S. K.; Popp, M.; Jones, H. G. 2002. Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought stress. **Journal of Experimental Botany** **53**: 131–138.
- Colmer, T. D. 2003. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell and Environment** **26**: 17–36.
- Corsi, G.; Bottega, S. 1999. New data on morphology and histochemistry in relation to function. **Annals of Botany** **84**: 657–664.
- Dell, B.; McComb, A. J. 1974. Resin production and glandular hairs in *Beyeria viscosa* (Labill.) Miq. (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany** **22**: 195–210.
- Duarte, M. G. R.; Soares, I. A. A.; Brandão, M.; Jácome, R. L. R. P.; Ferreira, M. D.; Silva, C. R. F.; Oliveira, A. B. 2002. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. **Revista Lecta** **20**(2): 177–182.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist** **108**: 229–257.
- Furr, M.; Mahlberg, P. G. 1981. Histochemical analyses of lactifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** **44**: 153–159.
- Geissman, T. A.; Griffin, T. S. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. **Phytochemistry** **10**: 2475–2485.
- Hardman, R.; Sofowora, E. A. 1972. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technology** **47**: 205–208.
- Haslam, E. 1998. **Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge, Cambridge University Press.
- Jaakola, L.; Maatta, K.; Pirttila, A. M.; Torronen, R.; Karenlampi, S.; Hohtola, A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. **Plant Physiology** **130**: 729–739.
- Jackson, M. B.; Armstrong, W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology** **1**: 274–287.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, Mc Graw Hill Book.
- Kaiser, E. 1880. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb** **180**: 25–26.
- Keating, R. 1984. Leaf histology and its contribution to relationships in the Myrtales. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **71**(3): 801–823.
- Lee, Y. L.; Najm, W. I.; Owens, J.; Thrupp, L.; Baron, S.; Shanbrom, E.; Cesario, T. 2008. Anti-microbial activity of urine after ingestion of cranberry: a pilot study. **eCAM: Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, Advance Access** (Jan): 1–6. <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/nem183v1>. (acesso em: 16/12/2009).
- Lempe, J.; Stevens, K. J.; Peterson, R. L. 2001. Shoot responses of six Lythraceae species to flooding. **Plant Biology** **3**: 186–193.
- Little, A. A.; Stockey, R. A.; Keating, R. C. 2004. *Duabanga*-like leaves from the Middle Eocene Princeton chert and comparative leaf histology of Lythraceae sensu lato. **American Journal of Botany** **91**(7): 1126–1139.
- Lopes, K. L. B.; Thadeo, M.; Azevedo, A. A.; Soares, A. A.; Meira, R. M. S. A. 2009. **Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae)**. **Botany** **87**(2): 202–209.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. de A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Mace, M. E.; Bell, A. A.; Stipanovic, R. D. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathology** **64**: 1297–1302.
- McDowell, E. M.; Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** **100**: 405–414.
- Mcmanus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** **23**: 99–108.
- Metcalfe, C. R.; Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. v. 1, Oxford, Clarendon Press.
- Monteiro, W. R.; de Moraes Castro, M.; Mazzoni-Viveiros, S. C.; Mahlberg, P. G. 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 349–357.
- Nobel, P. S.; Cavalier, J.; Andrade, J. L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. **Journal of Experimental Botany** **43**: 641–648.
- O'Brien, T. P.; Feder, N.; McCully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** **59**: 368–373.
- Pearse, A. G. E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology**. 4. ed. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Price, M. L.; Van Scoyoc, S.; Butler, L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **26**: 1214–1218.
- Rubanza, C. D. K.; Shem, M. N.; Ichinohe, T.; Fujihara, T. 2008. Quantification and characterisation of condensed tannin of selected indigenous browse tree species leaves of north-western Tanzania. **Journal of Food, Agriculture and Environment** **6** (2): 145–149.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Thadeo, M.; Meira, R. M. S. A.; Ascensão, L. 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. (Anacardiaceae). **Revista Árvore** **30** (3): 481–489.
- Scalbert, A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway, R. W.; Laks, P. E. (Ed.). Proceedings of the Second North American Tannin Conference on Plant Polyphenols: synthesis, properties, significance. New York, Plenum Press.
- Schuldt, E. Z.; Ckless, K.; Farias, M. R.; Ribeiro-do-Valle, R. M. 2000. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq. McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** **35**(2): 234–329.
- Schuldt, E. Z.; Farias, M. R.; Ribeiro-do-Valle, R. M.; Ckless, K. 2004. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine** **11**: 523–529.
- Serrato-Valenti, G.; Bisio, A.; Cornara, L.; Ciarallo, G. 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves and chemical analysis of the essential oil. **Annals of Botany** **79**: 329–336.
- Stevens, K. J.; Peterson, R. L.; Reader, R. J. 2002. The aerenchymatous phellem of *Lythrum salicaria* (L.): a pathway for gas transport and its role in flood tolerance. **Annals of Botany** **89**: 621–625.
- Stevens, K. J.; Peterson, R. L.; Stephenson, G. R. 1997. Morphological and anatomical responses of *Lythrum salicaria* L. (purple loosestrife) to an imposed water gradient. **International Journal of Plant Sciences** **158**: 172–183.
- Tattini, M.; Gravano, E.; Pinelli, P.; Mulinacci, N.; Romani, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. **New Phytologist** **148**: 69–77.
- Thadeo, M.; Meira, R. M. S. A.; Azevedo, A. A.; Araújo, J. M. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **32**(2): 329–338.
- Ventrella, V. C.; Marinho, C. R. 2008. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica** **31**(3): 457–467.
- Voisenek, L. A. C. J.; Colmer, T. D.; Pierik, R.; Millenaar, F. F.; Peeters, A. J. M. 2006. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist** **170**: 213–226.