

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALICE FREITAS DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO MORFOANATÔMICA E CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO DE
Hyptis stricta BENTH. (LAMIACEAE)

CURITIBA

2012

ALICE FREITAS DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO MORFOANATÔMICA E CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO DE
Hyptis stricta BENTH. (LAMIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Élide Pereira dos Santos

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

ALICE FREITAS DA SILVA

Título: **IDENTIFICAÇÃO MORFOANATÔMICA E CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO DE *HYPTIS STRICTA* BENTH. (LAMIACEAE)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Profª. Dra. Elide Pereira dos Santos
Orientadora



Profª. Dra. Márcia do Rocio Duarte
Universidade Federal do Paraná



Dr. Guilherme Schnell e Schühli
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa -
Florestas - Colombo/PR

Curitiba, 29 de março de 2012.

Dedico este trabalho à minha família, que é a estrutura primordial e apoio constante nos meus propósitos e decisões.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar esse sonho.

Ao REUNI, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a Dr^a Élide Pereira dos Santos, por ter me orientado ao longo desse processo, compartilhando seu conhecimento.

Ao técnico Nilson Belém Filho, pelo auxílio imprescindível na confecção das lâminas de morfoanatomia.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelas eletromicrografias.

À Prof^a Thelma Veiga Ludwig, do Departamento de Botânica, por gentilmente ter cedido o microscópio fotônico e à Prof^a Fabiane Gomes de Moraes Rego pelo auxílio com as sequências genéticas.

Às companheiras Cristiane Bezerra da Silva pelas discussões e pelas horas mais amenas compartilhadas e Marianna Ermano, pelos mesmos motivos e também pela revisão do texto.

A todos os professores, técnicos e funcionários não citados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho e ampliação do meu conhecimento.

Muito obrigada!

“Spes messis in semine”.
A esperança da colheita está na semente

Provérbio Latino

RESUMO

A família Lamiaceae compreende 236 gêneros e 7173 espécies de distribuição cosmopolita. É conhecida principalmente por seus óleos essenciais, ricos em terpenoides, especialmente na subfamília Nepetoideae. O gênero *Hyptis* é um dos principais na América do Sul, possui 280 espécies, das quais 202 ocorrem no Brasil, sendo 146 endêmicas. Os estudos farmacológicos com *Hyptis* demonstram suas propriedades medicinais. O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia externa e interna, realizar testes microquímicos e determinar o código de barras genético de *Hyptis stricta* Benth. O material vegetal foi coletado em Curitiba e um espécime foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes e permanentes com secções transversais e longitudinais à mão livre. Foram realizados testes microquímicos para detecção de lignina, substâncias lipofílicas, compostos fenólicos, amido e terpenoides. Para análise da epiderme e anexos foram utilizadas eletromicrografias em microscopia eletrônica de varredura. Para determinação do código de barras genético da espécie foram utilizadas as regiões *rbcl* e *matK*. *Hyptis stricta* é uma erva perene até 2 m com xilopódio e partes aéreas anuais, folhas simples oposta-cruzadas, serreadas nas margens. As inflorescências são cimosas com até 45 cm, as flores são andróginas, diclamídeas e zigomorfas. No limbo foliar, a epiderme é anfiestomática, com estômatos diacíticos, as paredes anticlinais das células epidérmicas são onduladas em ambas as superfícies. A cutícula é estriada em ambas as superfícies. O mesofilo é dorsiventral, com parênquimas paliçádico e esponjoso. O feixe vascular na nervura central é disposto em arco. O pecíolo é côncavo-convexo, com um feixe vascular em arco e dois feixes auxiliares voltados para a face adaxial. O caule é quadrangular com epiderme unisseriada e apresenta colênquima angular, quatro feixes vasculares angulares e outros feixes menores distribuídos em um cilindro descontínuo. Foi observada a presença de tricomas tectores simples e tricomas glandulares peltados e capitados no caule, pecíolo e limbo foliar. Os testes microquímicos detectaram a presença de substâncias lipofílicas na epiderme e tricomas tectores, lignina nas células xilemáticas e compostos fenólicos no caule, pecíolo e limbo foliar. Quanto ao código de barras genético, foi obtido consenso com 827 bases para a região *matK* e de 660 bases para a região *rbcl*, com similaridade de 97 a 99% com espécies de alguns gêneros pertencentes à subfamília Nepetoideae. Em suma, morfologicamente as características da inflorescência, brácteas involucrais e anteras unitecas são os principais caracteres diagnósticos de *Hyptis stricta*. Anatomicamente, os caracteres diagnósticos para a espécie são a distribuição dos estômatos e os feixes vasculares da nervura central e do pecíolo. As sequências das regiões *rbcl* e *matK* foram depositadas no Genbank.

Palavras-chave: Lamiaceae. Morfoanatomia. *rbcl*. *matK*.

ABSTRACT

The family Lamiaceae is cosmopolitan and comprises 236 genera and 7173 species. This group is well known for its essential oils, which are rich in terpenoids, especially in the subfamily Nepetoideae. In South America, *Hyptis* is one of the main genera of this subfamily and comprises 280 species. Of these species, 202 occur in Brazil and 146 are endemic to this country. Pharmacological studies of *Hyptis* have demonstrated that this taxon has medicinal properties. The objective of this work was to describe the external and internal morphology of *Hyptis stricta* Benth. (Lamiaceae), as well as to microchemically test and DNA barcode this species. Vegetative material was collected in Curitiba and a specimen was deposited in herbarium of the Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB). Semipermanent (from transversal, longitudinal, and freehand sections) and permanent slides were made. Microchemical tests were performed to detect lignin, lipophilic substances, phenolic compounds, starch and terpenoids. Scanning electron microscopy was used to analyze the epidermis. To barcode the species the *rbcL* and *matK* regions were analysed. *Hyptis stricta* is a perennial herb that reaches 2 m tall with xylopodia, aerial parts that are annual, and leaves that are simple and opposite with serrate margins. The inflorescences are cymes that reach 45 cm, the flowers are androgynous, dichlamydeous and zygomorphic. For the leaf blade, the epidermis is amphistomatic with diacytic stomata, the anticlinal walls of the epidermis are undulating on both surfaces. The cuticle is striate on both surfaces. The mesophyll is dorsiventral and heterogeneous with palisade and spongy parenchyma. The vascular bundle in the midrib forms an arch. The petiole is concave-convex with one vascular bundle in an open arc and two auxiliary bundles. The stem is square with a uniseriate epidermis, angular collenchyma, four vascular bundles and other smaller bundles distributed in a discontinuous cylinder. Simple, non-glandular, peltate glandular and capitate trichomes were observed on the stem, petiole and leaf blade. Microchemical tests revealed the presence of lipophilic substances in the epidermis and non-glandular trichomes, lignin in the xylem, phenolic compounds in the stem, petiole and leaf blade, and terpenoids in the leaf blade. DNA barcoding produced a consensus of 827 b for the *matK* region and 660 b for the *rbcL* region, with a similarity of 97 to 99% with species of genera belonging to the subfamily Nepetoideae. In summary, the morphological characteristics of the inflorescence and involucre bracts are the main diagnostic characters of *Hyptis stricta*. Anatomically, the distribution of vascular bundles in the midrib and petiole and epidermis amphistomatic are the main diagnostic characters for the species. The sequences were added to Genbank.

Keywords: Lamiaceae. Morphoanatomy. *rbcL*. *matK*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE	15
2.2 GÊNERO <i>Hyptis</i>	17
2.2.1 <i>Hyptis spicigera</i> Lam. e <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	18
2.2.2 <i>Hyptis pectinata</i> Poit.	18
2.2.3 <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	20
2.2.4 <i>Hyptis heterodon</i> Epling	21
2.2.5 <i>Hyptis stricta</i> Benth.	21
3 METODOLOGIA	23
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	23
3.2 MORFOLOGIA EXTERNA E INTERNA.....	24
3.3 TESTES MICROQUÍMICOS	25
3.4 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA	25
3.4.1 Extração do DNA.....	26
3.4.2 Amplificação em Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).....	26
3.4.3 Reação de Sequenciamento	27
3.4.4 Análise das Sequências	28
4 RESULTADOS	29
4.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA.....	29
4.2 DESCRIÇÃO ANATÔMICA	30
4.2.1 Caule	30
4.2.2 Folha	30
4.3 CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO	39
4.3.1 Amplificação e Sequenciamento da Região <i>matK</i>	39
4.3.2 Amplificação e Sequenciamento da Região <i>rbcL</i>	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais tem a finalidade de acrescentar rigor científico ao conhecimento popular e integrar diversas áreas do conhecimento (SILVA, 2010). Dentre as diversas metodologias de estudo, a morfoanatomia é uma ferramenta importante no controle de qualidade farmacognóstico, ao permitir a identificação correta da espécie (FIUZA *et al.*, 2010). Concomitantemente podem ser aplicados os testes microquímicos para identificar diferentes classes de compostos e sua disposição na planta (MACIEL, PINTO, VEIGA-JR., 2002).

A abordagem molecular é uma metodologia emergente para identificação de plantas. Fragmentos de DNA são sequenciados e alinhados para constituir o código de barras da espécie (AZEREDO, 2005). Desde 2004 foi formado o *Working Plant Group*, que faz parte do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), com a finalidade de criar e manter um banco de dados genético. A publicação mais recente do grupo é de 2009, recomendando que sejam sequenciadas as regiões do DNA plastidial *rbcL* e *matK*, para identificação molecular de espécies de plantas (CBOL, 2009).

Dentre as famílias com interesse medicinal, a família Lamiaceae é conhecida principalmente por seus óleos essenciais, presentes em tricomas glandulares distribuídos nas folhas e inflorescências. Além dessas substâncias há outros constituintes, que contribuem para suas reconhecidas propriedades antibacteriana, antifúngica, inseticida, antioxidante, dentre outras (HARLEY *et al.*, 2004).

O gênero *Hyptis*, um dos principais na América do Sul, possui 280 espécies. No Brasil ocorrem 202 espécies, destas 146 são endêmicas no país (HARLEY, 1985; HARLEY *et al.*, 2004; HARLEY *et al.*, 2010). Suas espécies estão organizadas em 26 seções dentre elas *Mesosphaeria*, que inclui *Hyptis stricta* Benth. (EPLING, 1949; HARLEY *et al.*, 2004). Existem estudos farmacológicos e fitoquímicos para cinco espécies desta seção, comprovando suas propriedades anti-inflamatórias (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2005), antinociceptivas (BISPO *et al.*, 2001), antimicrobianas (NASCIMENTO *et al.*, 2008), dentre outras.

Hyptis stricta apresentou atividade citotóxica em estudo preliminar (MONKS *et al.*, 2002), no entanto não possui ainda estudos morfoanatômicos e microquímicos e sequências de DNA depositadas no GenBank.

1.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a morfologia externa e interna, realizar testes microquímicos e determinar o código de barras genético de *Hyptis stricta* Benth. (Lamiaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coletar material para o estudo morfoanatômico e para extração de DNA.

Realizar a análise morfoanatômica de caule e folha da espécie.

Proceder aos testes microquímicos.

Sequenciar as regiões *rcbL* e *matK* e depositá-las no GenBank.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O principal intuito do estudo de plantas medicinais é racionalizar o seu uso, considerando ao mesmo tempo as práticas medicinais tradicionais e o rigor científico no cuidado à saúde, aproveitando os recursos naturais e a biodiversidade (SILVA, 2010).

O uso popular de plantas medicinais é uma alternativa terapêutica econômica (LUSA, 2010) e atrai o interesse de pesquisadores, envolvendo áreas multidisciplinares. Uma dessas áreas é a etnobotânica, que tem como principais enfoques a coleta e utilização medicinal das plantas, considerando a região, época e estágio de desenvolvimento no momento da colheita. Com a integração de diferentes áreas do conhecimento, incluindo a etnobotânica, química orgânica, fitoquímica, farmacologia, é possível a descoberta de novos fármacos (MACIEL, PINTO, VEIGA-JR., 2002).

Os estudos botânicos promovem a correta identificação de uma espécie, por meio da análise das características morfológicas e anatômicas (FIUZA *et al.*, 2010). A identificação morfológica baseia-se na observação de diversas características que, no conjunto, permitem diferenciar entre uma espécie e outra (SIEBERT, 2004).

Os estudos anatômicos podem auxiliar no controle de qualidade dos produtos vegetais, pela análise de fraudes e contaminações quando as plantas são comercializadas. Com isso, os medicamentos derivados de plantas podem ter sua eficácia e segurança garantidas (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO, 2010).

A análise anatômica é importante também quando existem espécies de uso popular muito semelhantes morfológicamente e difíceis de identificar. Em alguns casos os detalhes que diferenciam uma espécie da outra são muito sutis, como por exemplo a posição e a forma dos feixes vasculares na nervura central do limbo foliar ou do pecíolo (BASÍLIO *et al.*, 2006; MAURO *et al.*, 2008).

O estudo prévio dos constituintes químicos da planta, com aplicação de testes para investigar a presença de substâncias como ácidos graxos, terpenoides, esteroides, fenóis, alcaloides, cumarinas e flavonoides pode ser um instrumento para orientar futuras investigações mais aprofundadas (MACIEL, PINTO, VEIGA-JR., 2002). A avaliação microquímica é um método rápido e de baixo custo para

identificar a composição química presuntiva da planta e identificar em quais órgãos da planta estão localizadas as substâncias de interesse (LUSA, 2010).

Um exemplo da importância dos estudos microquímicos é demonstrado no estudo de SIEBERT (2004), em que as salvinorinas presentes em *Salvia divinorum* Epling & Játiva são encontradas nos tricomas glandulares peltados. Embora a planta apresente também tricomas glandulares capitados, estes não contêm essas substâncias.

Além dos estudos morfológicos e anatômicos, que identificam corretamente as plantas, e os testes microquímicos, que sinalizam seus principais constituintes e sua localização, a abordagem molecular se apresenta como uma nova metodologia para identificação de plantas. Nela, fragmentos do DNA são sequenciados, podendo constituir o código de barras da espécie. O código de barras molecular (DNA *barcoding*) pode identificar indivíduos de uma espécie. Essa metodologia permite integrar o sistema tradicional de identificação de espécies com novas possibilidades tecnológicas, associando os conhecimentos molecular e morfológico (AZEREDO, 2005).

O código de barras genético é designado para identificação de espécies usando regiões do DNA padronizadas como marcadores (HEBERT, GREGORY, 2005). O código de barras genético pode ser usado para determinar os limites entre as espécies pelos cientistas de outras áreas que usam os conceitos taxonômicos (CHASE *et al.*, 2005).

O *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) tem como finalidade estimular a criação de base de dados de referência, contendo sequências documentadas e com material testemunho (*voucher*) para servir como uma livraria universal em que, no futuro, poderão ser feitas comparações de taxons não identificados (KRESS *et al.*, 2005).

Para a determinação dos locos genéticos apropriados para o código de barras genético de plantas, três critérios devem ser satisfeitos: 1. nível de variabilidade e divergência significativa entre espécies; 2. sequência de pequeno comprimento entre 400 e 800 pb; e 3. a presença de sítios acompanhantes conservados para o desenvolvimento de *primers* universais (CHASE *et al.*, 2005; KRESS *et al.*, 2005, KRESS, ERIKSON, 2008).

As regiões *trnL-F* e *matK* são os locos plastidiais mais sequenciados em

plantas para propósitos filogenéticos. Outras duas regiões estudadas são as dos espaçadores intergênicos *trnH-psbA* e *trnL-F*, que foram satisfatoriamente amplificadas em oito gêneros e 19 espécies pertencentes a sete famílias de Angiospermas. Esse estudo baseou-se na análise do DNA plastidial sequenciado e depositado em banco de dados genético, comparando com duas espécies pertencentes a duas subfamílias da família Solanaceae. A região *trnH-psbA* demonstrou ser a melhor opção plastidial para uso como DNA *barcode*, por apresentar um bom sítio iniciador, comprimento e variação interespecífica (KRESS *et al.*, 2005).

O estabelecimento de códigos de barras genéticos é recente, foi proposto pela primeira vez por Hebert e colaboradores (2003). No ano de 2004 aconteceu a reunião inaugural do CBOL, onde foram formados os grupos de trabalho. Nos anos subsequentes foram realizadas duas conferências do grupo, a primeira no ano de 2005 em Londres e a segunda no ano de 2007 em Taiwan. No ano de 2009 foram publicadas as recomendações do CBOL *Plant Working Group* para o código genético de plantas.

De acordo com essa publicação, a região codificante *matK* e os espaçadores não codificantes *trnH-psbA* foram efetivos na identificação de 66% e 69% de espécies, respectivamente, num trabalho com 397 amostras. Individualmente eles possuem atributos altamente desejáveis num sistema de código de barras genético de plantas, apesar de não atenderem perfeitamente a todos os critérios estabelecidos. Esses marcadores amplificaram e sequenciaram satisfatoriamente 90% das espécies de angiospermas testadas, demonstrando alta resolução. O uso de mais de um *loci* é indicado por representar uma combinação sinérgica (CBOL, 2009).

Em 2009 o CBOL propôs que as regiões *rbcL* e *matK* fossem empregadas para o código de barras de plantas. O sequenciamento das duas regiões recomendadas é mais barato e mais rápido do que com três regiões, especialmente se a terceira é uma região não codificante que apresenta muitos problemas de qualidade no sequenciamento, como a região *trnH-psbA* (CBOL, 2009).

Os marcadores de DNA *barcoding* atualmente utilizados são ferramentas ainda não totalmente desenvolvidas comparando-se com a diversidade biológica a ser identificada, e as limitações no uso desses marcadores devem ser consideradas.

A principal dificuldade na identificação rápida e acurada de espécies relaciona-se com espécies próximas geneticamente e híbridos. Para tanto, o uso de regiões nucleares poderá resolver estes problemas (CHASE, FAY, 2009).

Hollingsworth, Graham e Little (2011) reafirmam que o processo de código de barras genético de plantas é mais recente se comparadas aos animais, e que por isso ainda tem muitos problemas a serem resolvidos. Um dos aspectos importantes ressaltados é a necessidade do depósito de material testemunho em herbário, além da sequência depositada no banco de dados genético, para permitir a rastreabilidade desse material. Quanto às regiões a serem sequenciadas para a identificação genética de plantas, os autores apresentam trabalhos de 2009 e 2010 com os marcadores *trnI-F*, *trnH-psbA*, *matK* e *rbcL* e apresenta ainda os principais projetos com código de barras genético em fase de planejamento ou desenvolvimento no mundo atualmente. Os autores concordam com as recomendações do CBOL, que atualmente preconizam o sequenciamento das regiões *matK* e *rbcL* para se obter o código de barras genético de plantas.

2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae compreende 236 gêneros e 7173 espécies de distribuição cosmopolita (HARLEY *et al.*, 2004). Existem no mundo seis regiões onde a família Lamiaceae apresenta grande diversidade, a saber: região mediterrânea e Ásia Central, sul da África e Madagascar, China, Austrália, América do Norte e México e América do Sul (HARLEY *et al.*, 2004). Na América do Sul, os dois principais gêneros da família com grande diversidade de espécies são *Salvia* e *Hyptis*, este último endêmico de regiões com formação geológica antiga (HARLEY *et al.*, 2004). No Brasil a família está representada por 34 gêneros e 498 espécies (HARLEY *et al.*, 2010).

As espécies da família Lamiaceae estão reunidas em oito subfamílias, incluindo a subfamília Nepetoideae (Dumort.) Luer., que subdivide-se em quatro tribos, dentre elas a Ocimeae Dumort., que por sua vez subdivide-se em cinco subtribos, sendo uma delas a Hyptidinae Endl., onde está posicionado o gênero

Hyptis (CANTINO, HARLEY, WAGSTAFF, 1992).

Muitas espécies da família, especialmente da subfamília Nepetoideae, são aromáticas, devido à presença de terpenoides. As espécies de Lamiaceae produzem grande variedade de compostos secundários, mas são conhecidas principalmente por seus óleos essenciais, encontrados em tricomas glandulares na superfície das folhas e inflorescências. Contudo, a produção de óleo essencial não é uma característica geral na família, é comum apenas na subfamília Nepetoideae. Esses consistem principalmente de monoterpenoides, como o mentol extraído do gênero *Mentha* e o timol extraído de *Thymus*, sesquiterpenoides, alguns fenilpropanoides voláteis como o eugenol e o metil cavicol encontrados em espécies de *Ocimum*. Diterpenoides abietanos são característicos da subfamília Nepetoideae e são encontrados em diversos gêneros, dentre os quais *Hyptis*. Muitos desses diterpenoides têm atividade biológica antibacteriana, antifúngica e inseticida (HARLEY *et al.*, 2004).

Na família também estão presentes os constituintes fenólicos, dentre eles o ácido rosmarínico, um éster do ácido cafeico com o ácido α -hidroxidiidrocafeico, encontrado quase que exclusivamente em espécies da subfamília Nepetoideae, podendo constituir mais que 3% do peso seco da planta, sendo um poderoso antioxidante (HARLEY *et al.*, 2004).

As plantas variam desde ervas anuais, bianuais ou perenes, até subarbustos, arbustos ou árvores. Os ramos em geral são tetragonares, com folhas simples e opostas, cujo limbo pode apresentar margem inteira, denteada, lobada ou partida. A inflorescência comumente deriva de ramos cimosos, e as flores são andróginas, diclamídeas e zigomorfas. O cálice é tubuloso, campanulado ou infundibuliforme, com bordo bilabiado. Nos gêneros pertencentes à tribo Ocimeae, subtribo Hyptidinae, o lábio inferior da corola é galeado, constrito e espessado na base e torna-se deflexo na antese. O androceu é formado por dois a quatro estames epipétalos, inseridos no tubo ou na fauce da corola. Os filetes são livres entre si, retos ou curvos, com ou sem apêndice, ou concrecidos em bainha aberta, através da qual passa o estilete. As anteras são bitecas ou unitecas. O ovário é bicarpelar e sincárpico, com estilete ginobásico. Em *Hyptis*, o estilete pode apresentar estilopódio, uma estrutura crassa, alongada e mais ou menos cônica na base. O fruto é seco, constituído por quatro núculas (HARLEY *et al.*, 2004).

Na família vários gêneros apresentam importância econômica, como algumas espécies dos gêneros *Salvia*, *Mentha*, *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Rosmarinus* e *Melissa* empregadas principalmente na culinária mediterrânea, e *Lavandula* e *Pogostemon* na perfumaria (HARLEY *et al.*, 2004).

Na medicina popular, a família Lamiaceae ocupa o terceiro lugar em ordem de importância, com muitas espécies apresentando substâncias biologicamente ativas (HARLEY *et al.*, 2004). *Salvia officinalis* L. apresenta propriedades benéficas para a saúde, como a proteção gástrica (MAYER *et al.*, 2009) e a redução da atividade inflamatória intestinal (JUHÁS *et al.*, 2008). Também foi observada nesta espécie a ação hipoglicemiante no tratamento experimental de animais com diabetes na forma leve (ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2002) e na prevenção do diabetes (LIMA *et al.*, 2006). Outra espécie importante para a saúde é *Rosmarinus officinalis* L., que possui componentes bioativos com atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e quimiopreventivas (AFONSO, SANT'ANA, MANCINI-FILHO, 2010).

2.2 GÊNERO *Hyptis*

As 280 espécies existentes de *Hyptis* estão organizadas em 26 seções, dentre elas *Mesosphaeria*, com 13 espécies, incluindo-se *Hyptis stricta* (EPLING, 1949; HARLEY *et al.*, 2004).

O gênero é um dos principais na América do Sul, principalmente na Guiana e nos campos brasileiros (HARLEY *et al.*, 2004). No Brasil são encontradas 202 espécies, sendo 146 endêmicas (HARLEY *et al.*, 2010).

O gênero *Hyptis* está posicionado na subtribo Hyptidinae, esta apresenta uma variação na estrutura anatômica foliar útil para a identificação taxonômica de suas espécies (HARLEY *et al.*, 2004).

Pastore e colaboradores (2011) publicaram estudo filogenético em que foram incluídas 180 espécies pertencentes à subtribo Hyptidinae, com o sequenciamento das regiões do DNA nucleares ITS e ETS e plastidial *trnL-F*, *trnS-G*, *trnD-T* e *matK*. Com seus resultados os autores sugeriram novos estudos

envolvendo maior número de espécies de *Hyptis*, principalmente na seção *Mesosphaeria*, que poderão contribuir na resolução dos problemas taxonômicos encontrados.

Hyptis, do grego *hyptios* (retroflexo), é provavelmente devido à corola dobrada para baixo, em forma de saco e encolhida na base. Também, caracteriza-se por suas flores dispostas em inflorescências cimosas formando panículas congestas, espigas, verticilos ou capítulos, ou raramente com flores dispostas em panículas amplas (HARLEY, 1985; HARLEY *et al.*, 2004).

Existem estudos farmacológicos e fitoquímicos para cinco espécies de *Hyptis* da seção *Mesosphaeria*: *H. heterodon* Epling, *H. pectinata* Poit., *H. spicigera* Lam., *H. suaveolens* (L.) Poit. e *H. umbrosa* Salzm. ex Benth.

2.2.1 *Hyptis spicigera* Lam. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

Hyptis spicigera e *Hyptis umbrosa* constam na revisão publicada por Falcão e Menezes (2003) onde eles citam estudos realizados até o ano de 2001 sobre as atividades farmacológicas e os óleos essenciais destas espécies.

Estudos realizados na África com *H. spicigera* demonstraram seu potencial como inseticida (JO, LA, EO, 2009) e antimicrobiano (LADAN *et al.*, 2009). Esta espécie também ocorre no Brasil, nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (HARLEY *et al.*, 2010).

2.2.2 *Hyptis pectinata* Poit.

Hyptis pectinata, conhecida popularmente como sumbacaitá, tem uso na forma de decocção e infusão (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008) para o tratamento de inflamação, infecções bacterianas, dor e câncer (BISPO *et al.*, 2001; ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008). A espécie está distribuída em todas as regiões do Brasil (HARLEY *et al.*, 2010).

A administração do extrato aquoso de *H. pectinata* em ratos revelou efeitos antinociceptivo e antiedematogênico, com baixa toxicidade, indicada pela administração de doses de 5 g/kg, sem efeito letal (BISPO *et al.*, 2001). Num outro trabalho, o extrato aquoso de *H. pectinata* na concentração de 100 mg/kg produziu regeneração hepática em ratos com hepatectomia parcial de 67% (SILVA *et al.*, 2002). Ainda, em ratos parcialmente hepatectomizados, o extrato aquoso de *H. pectinata* em associação à terapia a laser intraoperativa estimulou a regeneração hepática e provocou redução na função respiratória de mitocôndrias hepáticas sem alterar sua atividade fosforilativa (MELO *et al.*, 2005). O uso de extrato aquoso liofilizado de *H. pectinata* na concentração de 100 mg/kg melhorou o índice de regeneração hepática e de 200 mg/kg apresentou proteção hepática em ratos hepatectomizados (MELO *et al.*, 2006).

O uso de extrato aquoso de plantas de *H. pectinata* de origens diferentes interferiu na ação de vários mediadores químicos de inflamação, desde histaminas a prostaglandinas, indicando provável influência genética na composição das plantas. Dessa forma, ficou evidenciado que *H. pectinata* possui substância anti-inflamatória em sua composição (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2005). O extrato aquoso administrado em ratos demonstrou ação no sistema nervoso central, por meio de efeito antidepressivo, contudo sem que tenham sido isolados os compostos responsáveis por esse efeito (BUENO *et al.*, 2006).

H. pectinata pode conter até 0,5 % de seu peso seco de óleo essencial (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008). A composição dos óleos essenciais pode variar de acordo com o local da coleta e o estágio de desenvolvimento da planta. Foram isolados 33 compostos no óleo essencial de *H. pectinata*, sendo 96% monoterpenos (BISPO *et al.*, 2001). Num outro trabalho, 99% dos compostos encontrados foram sesquiterpenoides, conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2008). Nascimento *et al.* (2008) isolaram como principais compostos fenólicos no óleo essencial de *H. pectinata* os sesquiterpenoides β -cariofileno (28%), óxido de cariofileno (28%) e β -pireno (7%), conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana.

O uso do óleo essencial de *H. pectinata* em ratos produziu efeitos analgésicos tanto periféricos, caracterizado pela redução no número de contorções após a administração de ácido acético a 0,6%, como centrais, evidenciados pelo

atraso no tempo de reação ao contato com placa quente (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2008). Em testes microbiológicos, o óleo essencial apresentou atividade mais efetiva contra leveduras que bactérias Gram negativas, e inibiu bactérias Gram positivas apenas em grandes concentrações (SANTOS *et al.*, 2008). O óleo essencial, rico no composto químico β -cariofileno, apresentou efeito larvicida contra *Aedes aegypti*, mas não tão poderoso quando comparado com *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) (SILVA *et al.*, 2008). Em estudo *in vitro*, o óleo essencial de *H. pectinata* inibiu o crescimento de *Streptococcus mutans* de forma semelhante a clorexidina (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Dentre os componentes químicos de *H. pectinata*, foi elucidada a estrutura de α -pironas e 2(5H)-furanona, pertencentes ao metabolismo secundário normalmente associadas com *Hyptis* (BOALINO *et al.*, 2003).

2.2.3 *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Hyptis suaveolens é conhecido popularmente como bamburral, erva-canudo (MARTINS, SANTOS, POLO, 2006) e alfazema (MOREIRA *et al.*, 2010). Pode ser encontrado no Brasil em todas as regiões com exceção da região Sul, Índia, Malásia, Nigéria, Estados Unidos e Aruba (AZEVEDO *et al.*, 2001; HARLEY *et al.*, 2010).

O extrato aquoso de *H. suaveolens* apresentou efeito antinociceptivo periférico e central na concentração de 200 mg/kg em ratos, sem aliviar a dor associada a condições inflamatórias. Houve baixa toxicidade aguda (SANTOS *et al.*, 2007).

Quanto à composição, foi isolado em *H. suaveolens* o diterpenoide abietano endoperóxido, 13 α -epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol, com alta atividade antiplasmódica (CHUKWUJEKWU *et al.*, 2005). Moreira *et al.* (2010) isolaram o terpeno eucaliptol (48%) como o composto mais abundante do óleo essencial em *H. suaveolens*.

Avaliando-se a composição dos óleos essenciais de *H. suaveolens* coletados em 11 localidades diferentes do cerrado brasileiro, verificou-se que os monoterpenos foram seu principal constituinte (37-73%), e que sesquiterpenos são

produzidos principalmente a baixas altitudes, enquanto monoterpenos são produzidos a altas altitudes (AZEVEDO *et al.*, 2001). *Hyptis suaveolens* possui monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, com variação química conforme diferentes locais, fazendo com que haja variação no ataque de herbívoros (QUEIROZ-VOLTAN, STUBBLEBINE, SHEPHERD, 1995). Essa variação na composição das plantas deve-se muito provavelmente por influência genética e não tanto por fatores ambientais (MARTINS, SANTOS, POLO, 2006).

O uso do óleo essencial das folhas de *H. suaveolens* revelou forte atividade antifúngica, inibindo o crescimento de alguns *Aspergillus* potencialmente patogênicos, indicando potencial terapêutico para o tratamento de infecções causadas por *Aspergillus* (MOREIRA *et al.*, 2010).

2.2.4 *Hyptis heterodon* Epling

Hyptis heterodon é endêmica no Brasil, encontrada nos estados de São Paulo e da região Sul do país, em altitudes de 1000-1700 m, conhecida pelo nome popular de alfazema-braba (FALCÃO, 2003; HARLEY *et al.*, 2010).

O extrato bruto em metanol/clorofórmio das partes aéreas de *H. heterodon* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e de algumas cepas de *Streptococcus pyogenes*. Houve também resposta moluscicida do extrato etanólico, nas partições em acetato de etila e em álcool butílico (FALCÃO, 2003).

2.2.5 *Hyptis stricta* Benth.

Hyptis stricta é conhecida popularmente como salvina ou mentrasto-grado. É uma erva anual, exclusiva da zona dos campos do planalto meridional, encontrada preferencialmente em solos úmidos ou em banhados entre 700-1000 m de altitude. Ocorre no Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil nos estados do Paraná, Santa

Catarina e Rio Grande do Sul (HARLEY, 1985; HARLEY *et al.*, 2010).

Hyptis stricta apresenta potencial farmacêutico, de acordo com estudo preliminar *in vitro* empregando extratos orgânico e aquoso da planta. Foram utilizadas duas linhagens de células tumorais humanas, observando-se atividade citotóxica com os extratos das folhas e potente atividade inibitória do crescimento com os extratos do caule (MONKS *et al.*, 2002).

3 METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, diferentes métodos foram utilizados para a coleta e análise do material.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras do material vegetal foram coletadas em altitude de 932 m, 025°30'44,6"S 049°18,7'13"W, numa área de vegetação campestre, formada por um capão de floresta circundado por uma depressão brejosa. O espécime coletado por Santos *et al.*, nº 1255, foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB).

Para as análises de morfoanatomia, foram coletadas folhas adultas e caules (a partir do quinto nó, na porção mediana da lâmina) de cinco plantas saudáveis e representativas que foram fixadas em FAA 70 por um período de 24 a 72 horas (JOHANSON, 1940) e armazenadas em etanol a 70% (BERLYN, MIKSCHE, 1976). Para a descrição morfológica da folha empregaram-se as classificações propostas por Stearn (1983) e por Hickey (1988).

Para os testes microquímicos foram empregados caules e folhas fixados em FAA 70 e frescos.

Para a extração do DNA foram utilizados 100 mg das partes aéreas da planta acondicionadas em gel de CTAB (35g NaCl, 3g de CTAB) durante uma semana. Para o preparo do gel de CTAB foi utilizada placa aquecida a 60°C, com adição de água até completar 100 ml. O gel foi acondicionado em microtubos de 2 ml, mantidos em geladeira até o momento da coleta, de acordo com o protocolo do laboratório.

3.2 MORFOLOGIA EXTERNA E INTERNA

Os estudos da morfologia externa e a identificação da espécie foram realizados no Laboratório de Sistemática Vegetal e no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB). As análises do material foram feitas em microscópio estereoscópico. A ilustração botânica foi realizada por Marcelo Leandro Brotto.

Os estudos morfoanatômicos foram realizados no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica e no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para a análise anatômica foram confeccionadas lâminas semipermanentes, obtidas por meio de secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA, AKISUE, 1997). Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). A montagem das lâminas foi feita com glicerina a 50% (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e a lutagem com esmalte incolor (BEÇAK, PAULETTE, 1976).

Para a confecção das lâminas permanentes, as amostras foram incluídas em historresina, seccionadas em micrótomo de rotação, coradas com azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964) e montadas em resina sintética.

As análises microscópicas e registros fotográficos das lâminas semipermanentes, permanentes e dos testes microquímicos foram realizados em microscópio com câmera de captura acoplada.

A morfologia dos tricomas, dos estômatos e da cutícula e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras do terço médio do pecíolo e da lâmina foliar foram desidratadas e secas via ponto crítico com CO₂. As amostras foram fixadas em suporte metálico com fita adesiva de cobre, metalizadas com ouro.

As características epidérmicas, tais como paredes das células anticlinais, ornamentação da cutícula, classificação de estômatos e tricomas, foram analisadas de acordo com Metcalfe e Chalk (1988).

3.3 TESTES MICROQUÍMICOS

Para a detecção de lignina foi utilizada solução de floroglucina clorídrica (FOSTER, 1949). As lâminas foram montadas com material fixado em FAA 70, e fotografadas após 5 minutos (KRAUS e ARDUIN, 1997).

Substâncias lipofílicas foram detectadas com Sudam III (SASS, 1951). Foi utilizado material fixado e as lâminas foram fotografadas após 30 minutos (KRAUS e ARDUIN, 1997).

A presença de compostos fenólicos foi verificada com cloreto férrico a 10% (JOHANSEN, 1940). Foi utilizado material fixado, fotografado após um ou dois minutos (KRAUS, ARDUIN, 1997).

Para a detecção de amido foi utilizado lugol (BERLYN, MIKSCHE, 1976). Após cinco minutos as lâminas contendo material fixado foram fotografadas (KRAUS, ARDUIN, 1997).

A presença de terpenoides com grupo carbonila foi investigada com 2,4-dinitrofenil-hidrazina em HCl 2N (GANTER e JOLLÉS, 1969). Foram utilizados cortes com material fresco mantido em temperatura ambiente durante 10 minutos (DÔRES, 2007).

3.4 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA

As etapas de extração, amplificação e análise das sequências foram realizadas no Laboratório Multiusuários de Biologia Molecular, no Departamento de Botânica da UFPR.

3.4.1 Extração do DNA

No momento da extração o material mantido em gel de CTAB foi lavado em água destilada e macerado em cadinho com STE gelado (sacarose, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Em seguida foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 10°C. O líquido foi descartado.

Após essa etapa, a extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990). As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C durante 45 minutos em tampão de extração de CTAB, e mantido em bancada até atingir a temperatura ambiente. Utilizou-se tampão 2X CTAB (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; EDTA 20 mM; PVP 2%), purificado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado em isopropanol gelado e ressuspendido no tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

O DNA foi purificado em coluna seguindo as especificações do fabricante.

O DNA foi conferido em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1x, utilizando-se tampão de carregamento 5x a 60 volts durante 15 minutos. A seguir o gel foi fotodocumentado.

Após a purificação o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado no ultrafreezer -80°C.

3.4.2 Amplificação em Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram amplificadas duas regiões codificadoras do DNA plastidial, as regiões *matK* e *rbcL* de acordo com as recomendações do CBOL *Working Plant Group* (2009).

Para a região *matK* foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Ford *et al.* (2009), sendo o *forward* Xf (TAA TTT ACG ATC AAT TCA TTC) e o *reverse* 5r (GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG), sentido 3' a 5'.

Para a região *rbcL* foram empregados o iniciador *forward* *rbcLa_F* (ATG TCA

CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC) descrito por Kress e Erickson (2007) e o *reverse rbcLar_R* (TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC) descrito por Fay *et al.* (1997), sentido 3' a 5'.

Após a extração, purificação e quantificação do DNA, foram realizadas as amplificações em cadeia de polimerase (PCR) num volume de 40 µl. Ambas as regiões, *matK* e *rbcL*, foram amplificadas em 35 ciclos, com uso de termociclador.

Os reagentes da reação de amplificação da região *matK* empregados foram: buffer 1x, DMSO 4%, dntp 0,2 mM, BSA 0,1mg/mL, MgCl₂ 1,5 mM, 1µM de primer *forward* e *reverse*, taq 2U, 56,4 µl de DNA.

As condições da reação de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 94°C por um minuto e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Na amplificação da região *rbcL* empregaram-se os reagentes: buffer 1x, dntp 0,2 mM, BSA 0,1mg/mL, MgCl₂ 2,5 mM, 0,5mM de primer *forward* e *reverse*, taq 1U, 56,4 µl de DNA.

Para essa região as condições da reação de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna Qiagen® conforme as recomendações do fabricante. O DNA foi conferido em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1x, utilizando-se tampão de carregamento 5x a 60 volts durante 30 minutos. A seguir o gel foi fotodocumentado e quantificado.

3.4.3 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada para um volume final de 10 µl com fragmentos amplificados contendo 40 ng de DNA, 0,5 µM de iniciador, buffer 5x, 1 µl de Big Dye e água q.s.p. 10 µl. As condições empregadas foram: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto com 26 ciclos de desnaturação a 96°C 10 segundos,

anelamento a 50°C por 5 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos.

As amostras foram purificadas com acetato de amônio 7,5M, utilizando-se acetato de amônio (2 µl) e etanol absoluto (60 µl) em cada amostra de 20 µl, que foram mantidas durante 20 minutos no gelo e centrifugadas por 25 minutos a 13000 rpm a 10°C. Após a retirada do sobrenadante, foram centrifugadas com etanol a 70% por 10 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi retirado por inversão dos tubos. Essa etapa foi repetida mais uma vez, e os tubos foram mantidos abertos protegidos da luz por 12 horas.

As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida e levadas ao termociclador a 96°C por 5 minutos e 4°C por 1 minuto e em seguida mantidas no gelo durante 15 minutos. Em seguida foram sequenciadas em sequenciador automático com eletroforese capilar.

3.4.4 Análise das Sequências

Os cromatogramas e as sequências foram visualizados e editados no software Staden Package (STADEN, 1996). As sequências foram pré-processadas no Pregap4, onde foram configurados os parâmetros para o consenso: correspondência exata de no mínimo 15%, número máximo de blocos 70% e percentagem máxima de incompatibilidade 60%. No programa Gap4 as sequências foram editadas, baseando-se no índice de confiabilidade de 20 a 30 entre os cromatogramas para a escolha da base correta.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para verificar similaridades com espécies da família Lamiaceae, utilizando-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL, 1990). As sequências foram depositadas no GenBank.

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

Erva perene de até 2 m, ereta, com xilopódio, partes aéreas anuais. Folhas simples, decussadas, pubescente-glandulares, pecioladas com pecíolo (1-14 mm) pubescente-glandular; lâmina foliar ovalada, 14-55 x 10-34 mm, ocorrendo uma redução no comprimento em direção ao ápice caulinar, coriácea, simétrica, base e ápice obtusos, margem serrada, venação craspedódroma semicraspedódroma (FIGURA 1, 2C).

Inflorescências cimosas com até 45 cm de comprimento, axilares, ramificadas na base, 6-12 verticilastos, com 22-54 flores por verticilastro, brácteas (5-11 x 2-5 mm) involucrais sésseis, obtusas na base, agudas no ápice, pubescente-glandulares em ambas as faces, face abaxial acinzentada (FIGURA 1, 2A).

Flores andróginas, diclamídeas e zigomorfas; cálice (2-3 x 0,5-2 mm) na antese, acrescente no fruto (4-5 x 2-3 mm) pubescente, gamossépalo, tubo alongado, com cinco lacínios iguais; corola (2-4 mm de comprimento) rosada a púrpura, pubescente, bilabiada, tubular, duas pétalas superiores iguais, uma pétala inferior cimbiforme, duas pétalas laterais iguais, androceu com quatro estames epipétalos, didínamos, anteras basifixas, unitecas, deiscência longitudinal; ovário súpero, com estilete ginobásico, estigma bifido. Fruto constituído por quatro núculas (1-1,5 mm de comprimento), ovoides, lisas, marrom escuras quando maduras (FIGURA 1, 2B)

Floresce nos meses de janeiro a março.

4.2 DESCRIÇÃO ANATÔMICA

4.2.1 Caule

O caule apresenta-se com formato quadrangular, com as células da epiderme arredondadas ou alongadas anticlinalmente em secção transversal (FIGURA 4A, B). Na epiderme encontram-se tricomas tectores e glandulares.

Os tricomas tectores são simples, formados por 1-3 células, algumas vezes numa base formada por 3-4 células de tamanho maior em relação às outras células da epiderme. Os tricomas glandulares do tipo peltado são abundantes, e os tricomas glandulares capitados curtos, raros.

A epiderme é uniestratificada, com presença de colênquima angular formando 10 a 12 camadas de células. Há uma camada de células subepidérmicas formada por três ou quatro camadas de células com espaços vazios entre si, intercalada por regiões com colênquima em torno do caule (FIGURA 4B, C).

O sistema vascular está disposto em cilindro descontínuo, com quatro feixes vasculares principais nos ângulos colenquimáticos intercalados por quatro a cinco feixes menores (FIGURA 4A). Há presença de cambium vascular e o xilema apresenta 14 a 24 raios dispostos radialmente em camadas de uma a quatro células. O parênquima medular é formado por células isodiamétricas, de tamanho irregular (FIGURA 4B).

Os testes microquímicos indicaram a presença de compostos fenólicos nos tricomas glandulares, nas células subepidérmicas e no floema (FIGURA 6B). Foi evidenciada a presença de lignina nas paredes das células do xilema e substâncias lipofílicas foram verificadas na cutícula da epiderme e nos tricomas tectores.

4.2.2 Folha

Na lâmina foliar, em vista frontal, as paredes anticlinais das células

epidérmicas são onduladas nas superfícies adaxial (FIGURA 3A) e abaxial. Tricomas glandulares e tectores estão presentes em ambas as superfícies, mais numerosos na face abaxial (FIGURA 3B). Os tricomas tectores são simples, com uma a quatro células, sendo que em alguns deles a última célula é ornamentada (FIGURA 3B, C). Os tricomas glandulares são capitados, curtos e longos na superfície adaxial (FIGURA 3E, F), e capitados curtos e peltados (FIGURA 3C, D), predominantes na superfície abaxial. A análise em microscópio eletrônico de varredura indicou que a cutícula da epiderme é estriada nas superfícies abaxial (FIGURA 3C, D) e adaxial.

Em secção transversal, a epiderme é unisseriada, com células alongadas anticlinalmente e periclinalmente na face adaxial (FIGURA 5B). Na face abaxial as células são arredondadas e menores que as células da face adaxial, com tamanho maior na base dos tricomas. A folha é anfiestomática, com estômatos diacíticos (FIGURA 3A), mais numerosos na superfície abaxial. A face externa da epiderme e os tricomas tectores são cutinizados em ambas as superfícies (FIGURA 5E, F).

O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico na face adaxial, ocupando em torno de 50% da área do mesofilo, e parênquima esponjoso na face abaxial, formado por 4-5 camadas de células (FIGURA 5A, B).

Na região da nervura central observou-se que o feixe vascular é colateral disposto em arco, com floema voltado para a face abaxial, com presença de células esclerenquimáticas externas ao feixe, voltadas para a face abaxial (FIGURA 5C, D).

A epiderme no pecíolo é uniestratificada, cutinizada, com tricomas tectores simples formados por uma a três células, mais curtos e maiores que os da lâmina foliar. Os tricomas glandulares são peltados ou capitados curtos (FIGURA 4F).

O pecíolo em secção transversal apresenta formato levemente côncavo na face adaxial e convexo na face abaxial. Há presença de colênquima em ambas as faces, formando até três camadas na face abaxial, e cinco a sete camadas na face adaxial. A vascularização é colateral em arco aberto, com dois feixes auxiliares voltados para face adaxial (FIGURA 4F).

Os testes microquímicos no limbo foliar e no pecíolo indicaram a presença de compostos fenólicos no feixe vascular, no floema e no mesofilo, em tricomas glandulares na face abaxial da nervura central (FIGURA 6B). Substâncias lipofílicas foram encontradas no revestimento de cutina da epiderme e nos tricomas tectores

(FIGURA 5E, F). Os terpenoides foram localizados na epiderme da nervura central e na região do feixe vascular e nos tricomas glandulares peltados na face abaxial do limbo foliar (FIGURA 6C, D). As células xilemáticas na região da nervura central (FIGURA 6A) e no pecíolo são lignificadas.

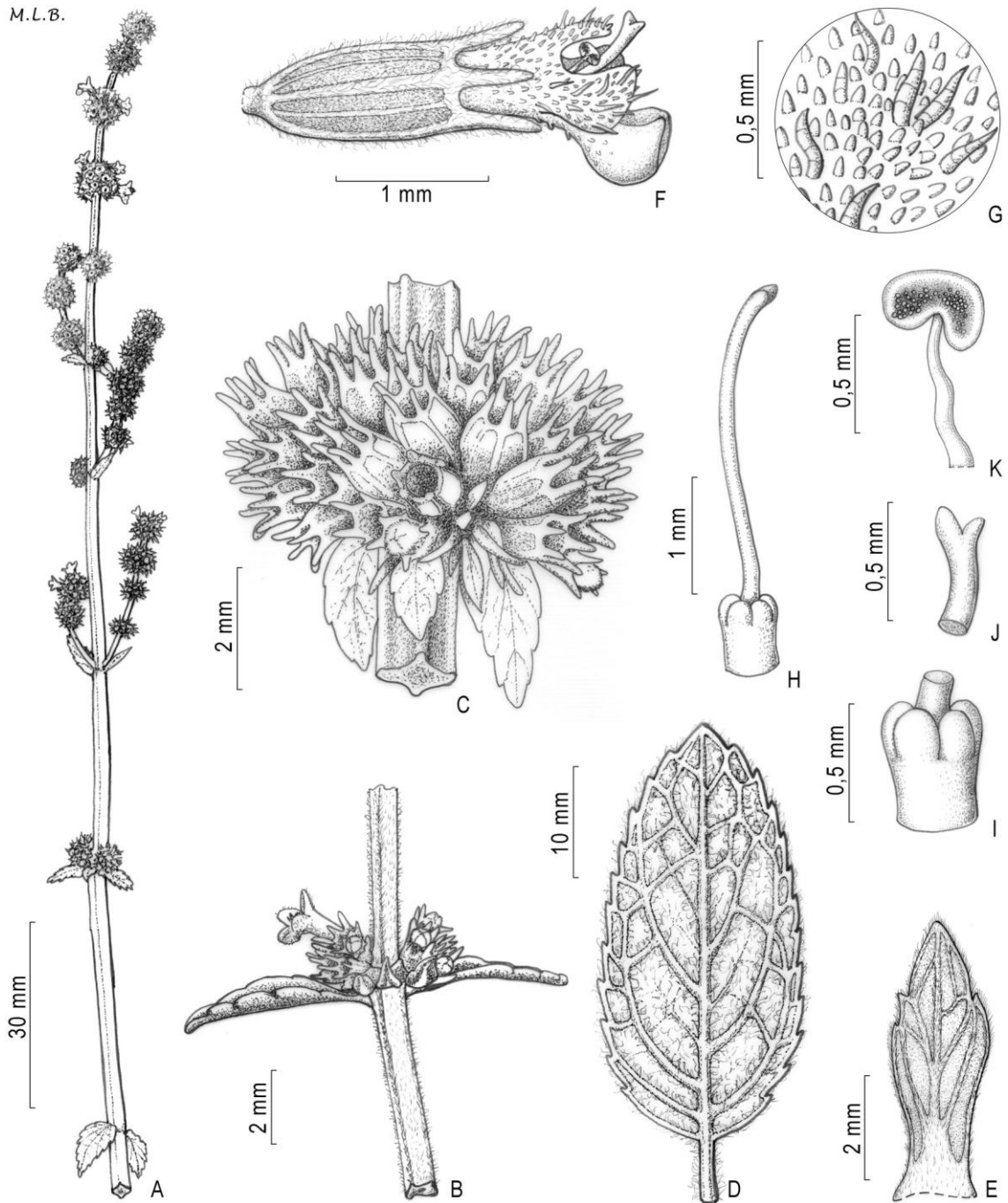


FIGURA 1. ILUSTRAÇÃO BOTÂNICA DE *Hyptis stricta* BENTH. A. ASPECTO GERAL DA INFLORESCÊNCIA. B. VERTICILASTRO DA BASE DA INFLORESCÊNCIA. C. DETALHE DO VERTICILASTRO. D. FACE ABAXIAL DA FOLHA. E. BRÁCTEA INVOLUCRAL. F. FLOR. G. DETALHE DO INDUMENTO DA COROLA. H. PISTILO. I. OVÁRIO COM ESTILETE GINOBÁSICO. J. ESTIGMA BÍFIDO. K. ANTERA BASIFIXA COM DEISCÊNCIA LONGITUDINAL.



FIGURA 2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE *Hyptis stricta* BENTH. A. INFLORESCÊNCIA. B. DETALHE DA INFLORESCÊNCIA. C. FOLHA PECIOLADA, COM LIMBO OVALADO, FACES ADAXIAL (ad) E ABAXIAL (ab).

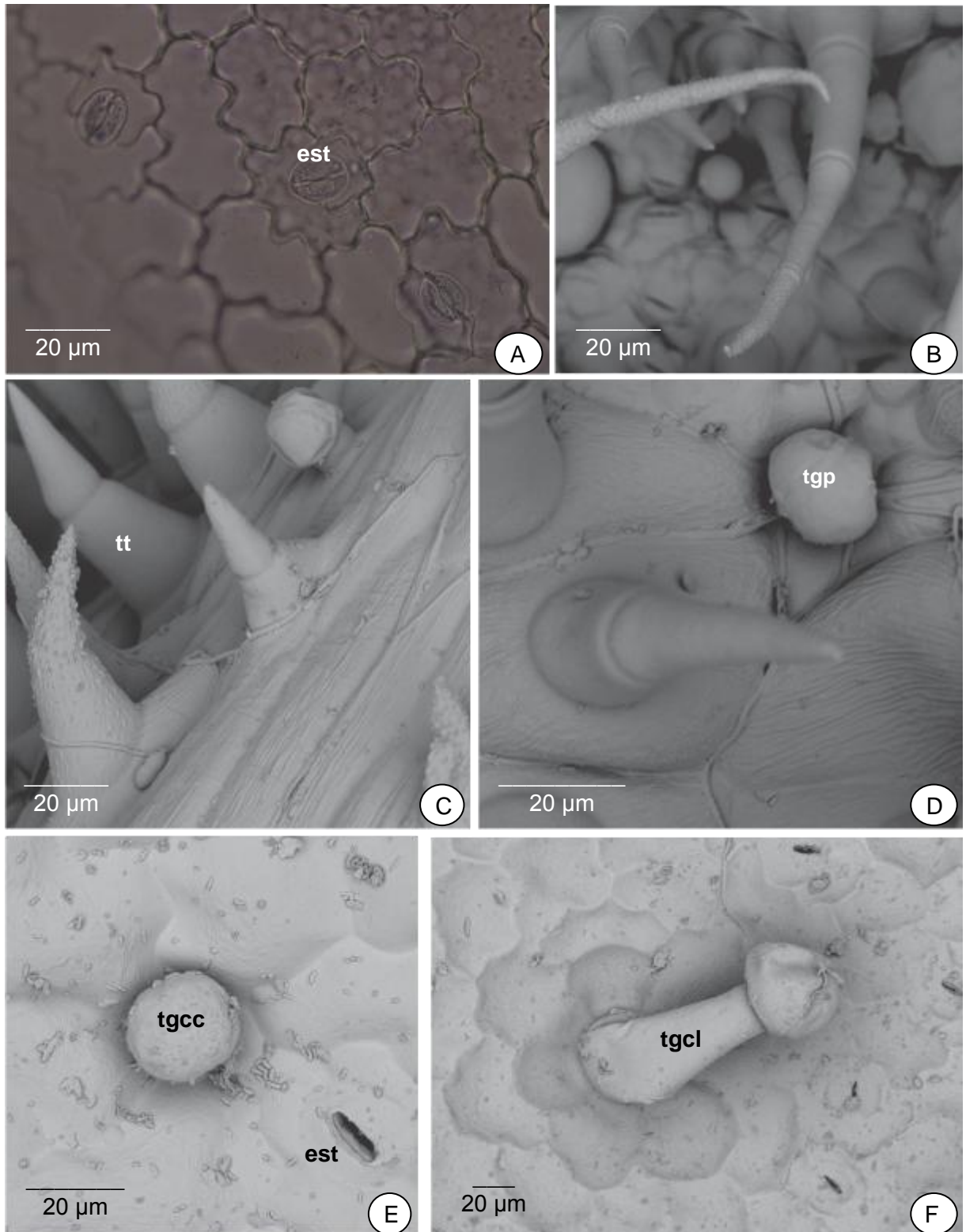


FIGURA 3. *Hyptis stricta* BENTH. (LAMIACEAE). A. SUPERFÍCIE ADAXIAL DA LÂMINA FOLIAR EM SEÇÃO PARADÉRMICA. B-F. MEV DA LÂMINA FOLIAR. B-D. SUPERFÍCIE ABAXIAL. E-F. SUPERFÍCIE ADAXIAL. Legenda: est: estômato; MEV: microscopia eletrônica de varredura; tgcc: tricoma glandular capitado curto; tgcl: tricoma glandular capitado longo; tgp: tricoma glandular peltado; tt: tricoma tector.

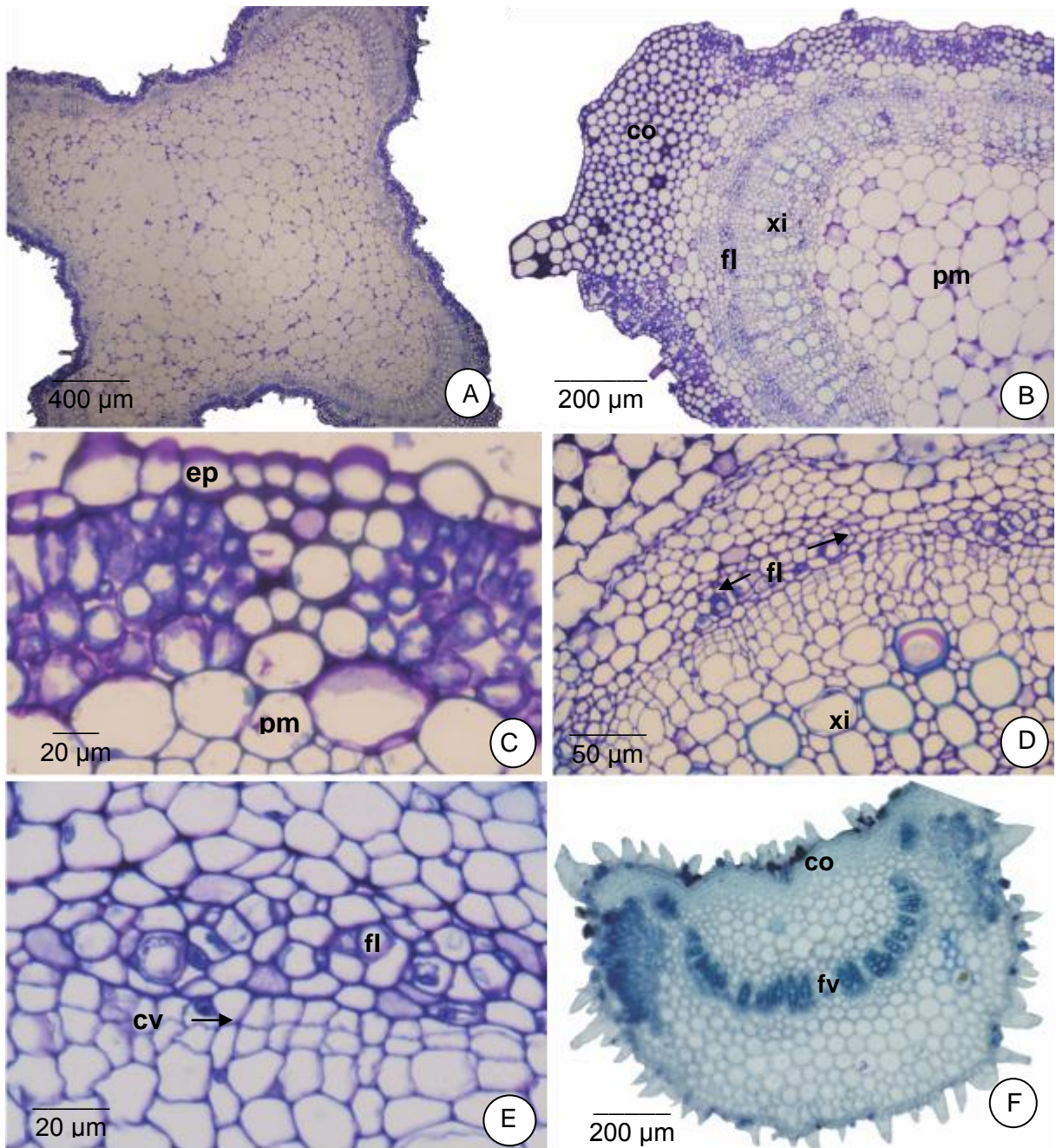


FIGURA 4. *Hyptis stricta* BENTH. (LAMIACEAE). A-E. CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL. A. CAULE QUADRANGULAR. B. REGIÃO ANGULAR DO CAULE. C. CÉLULAS SUBEPIDÉRMICAS. D. REGIÃO DO FEIXE VASCULAR. E. FEIXE VASCULAR COM FLOEMA E CÂMBIO VASCULAR. F. PECÍOLO COM FEIXE VASCULAR EM ARCO E DOIS FEIXES AUXILIARES. Legenda: co: colênquima; cv: câmbio vascular; ep: epiderme; pm: parênquima medular; fl: floema; xi: xilema.

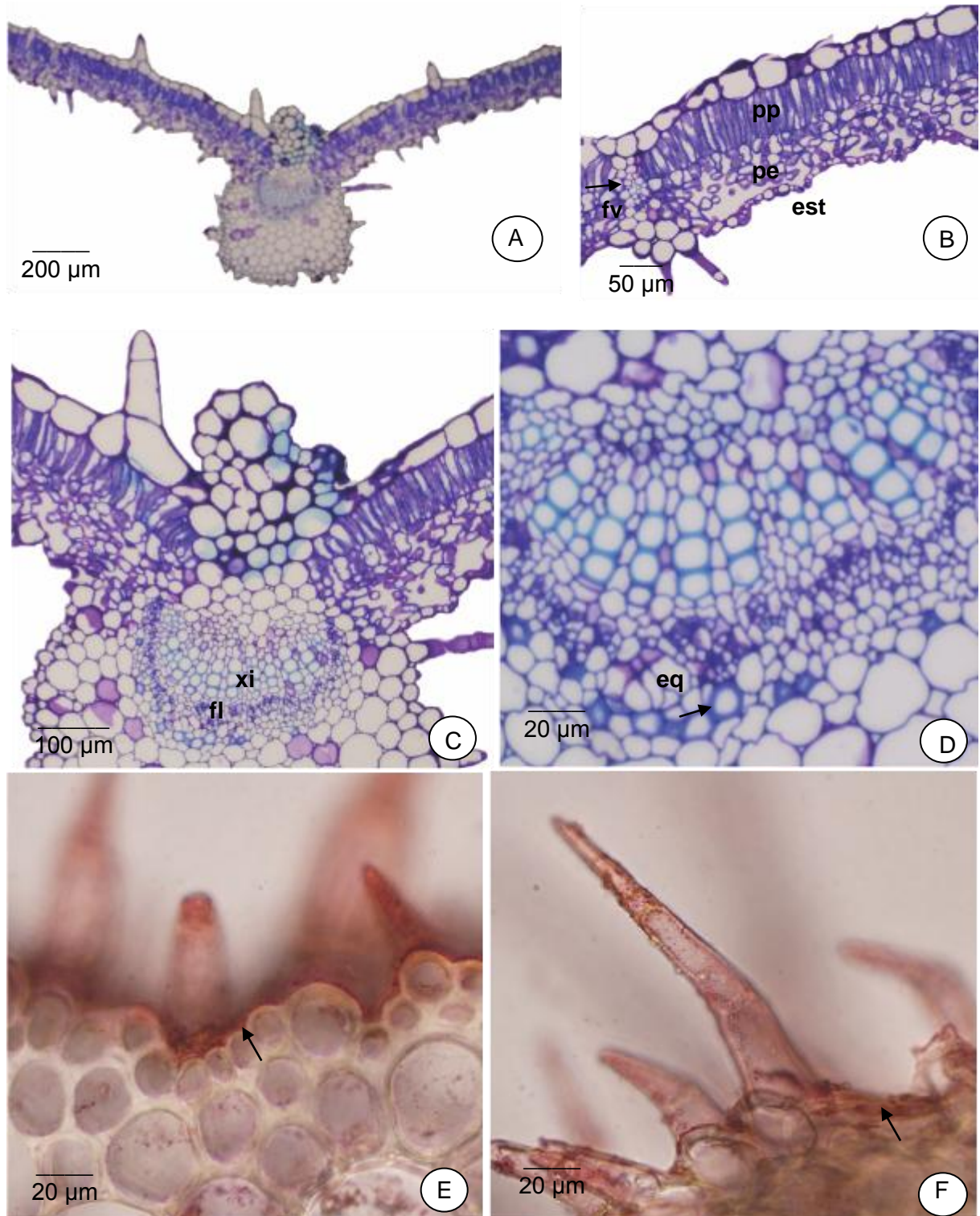


FIGURA 5. *Hyptis stricta* BENTH. (LAMIACEAE). A-D. LÂMINA FOLIAR EM SECÇÃO TRANSVERSAL. A. REGIÃO DO MESOFILO E DA NERVURA CENTRAL. B. REGIÃO DO MESOFILO. C-D. REGIÃO DA NERVURA CENTRAL. E-F. TESTE MICROQUÍMICO COM SUDAM III INDICANDO A PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS LIPOFÍLICAS NA CUTÍCULA. Legenda: cc: cutícula; co: colênquima; eq: esclerênquima; est: estômato; fl: floema; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pm: parênquima medular; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema.



FIGURA 6. TESTES MICROQUÍMICOS EM *Hyptis stricta* BENTH. (LAMIACEAE). A, C-D. LÂMINA FOLIAR. B. CAULE. A. FLOROGLUCINA CLORÍDRICA INDICANDO PRESENÇA DE LIGNINA NAS CÉLULAS XILEMÁTICAS DA NERVURA CENTRAL. B. CLORETO FÉRRICO, PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS CÉLULAS SUBEPIDÉRMICAS E NO FLOEMA. C-D. 2,4-DINITROFENIL-HIDRAZINA. C. TERPENOIDES NA REGIÃO DO FEIXE VASCULAR. D. TERPENOIDES EM TRICOMA GLANDULAR PELTADO, FACE ABAXIAL.

4.3 CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO

Após a extração e purificação do DNA, obteve-se 28,2 ng/μl de DNA total (FIGURA 7A), que foi empregado nas reações de amplificação para *matK* e *rbcL*.

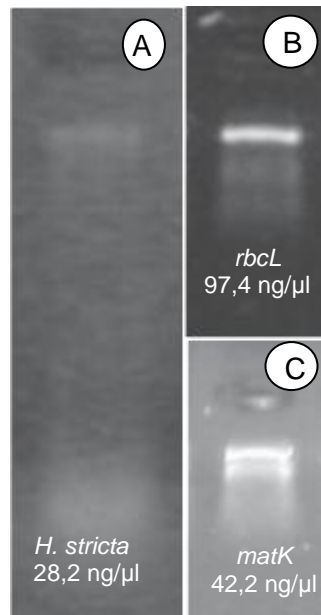


FIGURA 7. *Hyptis stricta* BENTH (LAMIACEAE). A-C. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X, COM BROMETO DE ETÍDIO. A. RESULTADO DA EXTRAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE DNA TOTAL. B. RESULTADO DA AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA REGIÃO *matK*. C. RESULTADO DA AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA REGIÃO *rbcL*.

4.3.1 Amplificação e Sequenciamento da Região *matK*

Para a região *matK* foram realizadas três amplificações, até adequar as concentrações das reações e condições da amplificação. Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna e quantificados, obtendo-se 42,2 ng/μl (FIGURA 7B). Utilizaram-se 33,8 ng do produto deste PCR na reação de sequenciamento. Foram sequenciadas 710 bases com o iniciador *forward* e 870 com o *reverse*. Os cromatogramas apresentaram picos duplos com o iniciador *forward* e sinal de baixa intensidade com o iniciador *reverse*, ao longo da sequência, e não foram usadas nos consensos.

Outra reação de amplificação foi feita obtendo-se 48,9 ngµl do produto de PCR após a purificação. Esses fragmentos amplificados foram empregados nas duas reações de sequenciamento subsequentes. Em ambas usaram-se 48,9 ng de DNA, obtendo-se na primeira sequências de 590 bases com o iniciador *forward* e 920 com o iniciador *reverse*, e na segunda 610 bases com o iniciador *forward* e 470 bases com o *reverse*. Os cromatogramas apresentaram sinais com maior intensidade que no primeiro sequenciamento.

O consenso para a região *matK* foi obtido a partir das melhores sequências, que foram o *forward* e o *reverse* do segundo sequenciamento e o *forward* do terceiro sequenciamento, resultando em 827 bases (FIGURA 8).

Com essa sequência foi realizado o BLAST, encontrando similaridade de 97% com *Ocimum gratissimum* L., com 3 *gaps* em 828 bases e de 96% com *Ocimum basilicum* L., com 2 *gaps* em 802 bases, tendo ambas um valor-e de 0%. Esse valor-e indica alta confiabilidade e baixa probabilidade de se obter outro alinhamento com escore igual ou superior empregando-se outra sequência aleatória do mesmo tamanho e composição de letras. Estas espécies pertencem à subfamília Nepetoideae, em que está inserido o gênero *Hyptis*.

Após a confirmação das sequências, foi realizado o depósito no GenBank, sob o nº 1520865.

```

TTTAAAAATTTGTGTTAGATATACTAATACCTCACTCTGTCCATGTGGAAAT
CTTGATTCAAACTCTTCGCTATTGGGTAAAAGATGTTTCTTCTTTGCATTTATTACGAG
TCTTTCTCAACCAATATTGTAGTCTTATTACTCCAAGAAAGTAAGCTCCTCTTTGTCA
AAAAGAAATCAAAGATTCTTTTTTTTCTTATATAATTCTCATGTATATGAATACGAATCT
ATTTTCGTCTTTCTACGTAACCAATCTTTTCATTTACGATCAACATCTTCTGGAGTTCT
TCTTGAACGAATCTATTTCTATATAAAAATAGAAGGTCTTGTGAATATCTTTGTAAAGG
ATTTTTGGACGAACCTATGGTTGGTCGAGGAACCCTGCATGCATTATATTAGGTATC
AAGGAAAAGCCTTTCTGGCTTCAAAGGGACATCTCTTTTGATGAATAAATGGAAATT
TTACCTTGTCACCTTTTGGCAATGGCATTTTTTGGTGTGGTTTCATCCAAGAAGGATT
TGTATAAATCAATTTTCCAAGCATTCCCTTGAAATATTTGGCTATCTTTCAAACGTGCA
AACGGGCTCTTCCGTGGTACGGAGTCAAATTCTAGAAAATGCATTTCTAATCAATAAT
GCTATTAAGAAGCTCGATACCCTTGTCCAATTATTCCTCTGATTGTGAAATTGGCTA
AAGAGAAATTTGTAACGTATTGGGGCATCCCATTAGTAAGCCGATTTGGGCTGATT
TATCAGATTCTAATATTATTGACCGATTTGGGCGTATATGCAGAAAATTTTCTCATTAT
CATAGCGGATCTTCC

```

FIGURA 8. SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *matK* DE *Hyptis stricta* BENTH (LAMIACEAE).

4.3.2 Amplificação e Sequenciamento da Região *rbcL*

Após a reação de amplificação da região *rbcL* e purificação, obtiveram-se 97,4 ng/μl de produto de PCR (FIGURA 7C), empregado na primeira e na segunda reações de sequenciamento.

No primeiro sequenciamento, com 39 ng de produto de PCR, obteve-se a leitura de boa qualidade de 360 bases com o iniciador *forward* e de 700 bases com o *reverse*, mas com o sinal de baixa intensidade.

Foi realizado outro sequenciamento, com 68 ng de DNA, obtendo-se a leitura de 580 bases com o iniciador *forward* e 590 bases com o *reverse*, porém com saltos e picos duplos nos cromatogramas, sendo estes descartados.

Realizou-se uma nova reação de amplificação da região *rbcL*, obtendo-se 40,9 ng/μl de produto de PCR. Foram empregados 40,9 ng de produto de PCR na reação de sequenciamento, obtendo-se a leitura de 610 bases com o iniciador *forward* e 710 bases com o *reverse*. Os cromatogramas mostraram que o sinal foi de baixa intensidade; no *forward* houve saltos e picos duplos enquanto que no *reverse* os picos estavam melhor definidos. A sequência do *reverse* foi empregada no consenso, juntamente com a sequência *forward* e *reverse* do primeiro sequenciamento.

O consenso para a região *rbcL* resultou em 660 bases (FIGURA 9).

Com essa sequência foi realizado o BLAST, encontrando similaridade de 99% com *Salvia lutescens* Koidz., *S. isensis* Nakai ex H. Hara, *S. japonica* Thunb. e *S. glabrescens* (Franchet & Savatier) Makino, e com 98% de similaridade com *S. officinalis* L., todos com 2 *gaps* em 661 bases e valor-e de 0% e de 98% com *Plectranthus barbatus* Andrews, com 4 *gaps* em 649 bases e valor-e de 1%. Os dois gêneros pertencem à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae.

Após a confirmação das sequências, foi realizado o depósito no GenBank, sob o nº 1520865.

CAGAGACTAAAGCAAGTGTTGGATTCAAAGCGGGTGTTAAAGAGTACAAATTGAATTATTATAC
TCCTCAATACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGG
AGTTCCGCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAA
CTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGAG
CCCGTTCCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAG
AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTACG
TGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGGATCCAATCTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACT
ATTAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAACTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCG
GTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCACCCATTTATGCGTTGGAGAG
ACCGCTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAA

FIGURA 9. SEQUÊNCIA DA REGIÃO PLASTIDIAL *rbcL* DE *Hyptis stricta* BENTH (LAMIACEAE).

5 DISCUSSÃO

Os caracteres morfológicos encontrados em *Hyptis stricta* estão de acordo com a descrição de Harley (1985). Morfologicamente a espécie diferencia-se de *H. pectinata* e de *H. suaveolens*, duas espécies pertencentes à mesma seção, pelas características das flores e inflorescências (BASÍLIO *et al.*, 2006). As características morfológicas das três espécies estão sumarizadas na TABELA 1.

TABELA 1. COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Hyptis stricta*, *Hyptis pectinata* E *Hyptis suaveolens*.

Característica	<i>H. stricta</i>	<i>H. pectinata</i> *	<i>H. suaveolens</i> *
Porte da planta (m)	Até 2	1-2	Até 1
Lâmina foliar (cm)	1,4-5,5 x 1,0-3,4	1,0-2,5 x 0,8-1,6	4,0-8,0 x 3,0-5,5
Formato da lâmina	Ovalado	Ovalado ou elíptico	Ovalado ou subcordado
Base do limbo	Obtusa	Obtusa	Obtusa
Ápice do limbo	Obtuso	Agudo	Agudo
Margem	Serrejada	Serrejada ou crenada	Serrejada
Pecíolo (cm)	0,1-1,4	0,5-1	3,0-8,0
Inflorescência	Terminal	Terminal	Axilar
Nº de flores	22-54	60-100	10-20
Nº de verticilastos	6-12	-	-
Tamanho inflorescência (cm)	Até 45	20-50	-
Brácteas involucrais (mm)	5-11 x 2-5	2-4	1
Cálice (mm)	2-3 x 0,5-2	2-3	4-5
Lacínios do cálice	Iguais	Subiguais	Iguais ou subiguais
Coloração da corola	Rosada a púrpura	Alva a rósea	-
Estames	4	4	4
Anteras	Unitecas	Bitecas	Bitecas
Corola compr. (mm)	3-4	1-2	-

* De acordo com a descrição apresentada por BASÍLIO *et al.* (2006) para *H. pectinata* e *H. suaveolens*.

Segundo as informações apresentadas na tabela 1, é possível distinguir *H. stricta* das outras duas espécies da seção principalmente pela posição da inflorescência, número de verticilastos e de flores e anteras unitecas e comprimento das brácteas involucrais.

A venação na família Lamiaceae é usualmente camptódroma a

semicraspedódroma, ocasionalmente broquidódroma, mas apresenta muita variação (HARLEY *et al.*, 2004). Em *H. stricta* a venação é craspedódroma semicraspedódroma, da mesma forma que ocorre na subseção *Gnidifoliae* da seção *Eriosphaeria*, enquanto na seção *Pachyphyllae* a venação é broquidódroma (RUDALL, 1986). Por outro lado, em *Hyptis* do cerrado brasileiro pode haver variação entre venação camptódroma e broquidódroma ou mista (MATOS, 1969).

Para maior clareza na discussão, as características anatômicas de *H. stricta* foram comparadas com *H. pectinata* e *H. suaveolens* (TABELA 2), de acordo com a descrição apresentada por Basílio *et al.* (2006).

TABELA 2. COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DE FOLHA DE *Hyptis stricta*, *Hyptis pectinata* E *Hyptis suaveolens*.

Característica	<i>H. stricta</i>	<i>H. pectinata</i> *	<i>H. suaveolens</i> *
Ep. face adaxial	Ondulada	Poligonal L reta	Ondulada
Ep. face abaxial	Ondulada	Ondulada	Ondulada
Tricomas tectores	Simples	Simples	Simples
Tric. glandulares	Peltados/capitados curtos	Capitados curtos	Capitados curtos/longos
Dist. estômatos	Anfiestomática	Hipoestomática	Anfiestomática
Tipo de estômato	Diacítico	Diacítico	Diacítico
Camadas ep.	Uniestratificada	Uniestratificada	Uniestratificada
Mesofilo	Dorsiventral	Dorsiventral	Dorsiventral
P. paliçádico	Uniestratificado até 50%	Uniestratificado até 50%	Uniestratificado
P. esponjoso	4-5 estratificado	5-6 estratificado	6-7 estratificado
Nervura central	Arco	Arco, 2 feixes aux.	Arco, 2 feixes aux.
Col. nerv central	5-8 seriado	3-4 seriado	1-3 seriado
Vasc. pecíolo	Arco, 2 feixes aux.	6 feixes, circular	Arco, 2 feixes aux.
Colênquima pecíolo	Até 3 camadas	1-6 seriado	1-3 seriado

* De acordo com a descrição apresentada por BASÍLIO *et al.* (2006) para *H. pectinata* e *H. suaveolens*.

Nota: aux.: auxiliar; col.: colênquima; dist.: distribuição; ep.: epiderme; nerv.: nervura; p.: parênquima; tric: tricoma; vasc.: vascularização

A epiderme da lâmina foliar com paredes anticlinais onduladas pode ser encontrada tanto na seção *Pachyphyllae* quanto na seção *Eriosphaeria*, subseção *Gnidiifoliae*, embora em ambas as seções possa haver variação entre paredes anticlinais retas a onduladas em diferentes espécies (RUDALL, 1986). Essa variação das paredes anticlinais da epiderme ocorre também na seção *Mesosphaeria*, como

em *H. pectinata* com células poligonais retas na face adaxial e paredes onduladas na face abaxial e em *H. suaveolens* as paredes das células são onduladas em ambas as superfícies (BASÍLIO *et al.*, 2006), caráter também observado em *H. stricta*.

A presença de hipoderme na região da lâmina foliar pode diferenciar seções do gênero (RUDALL, 1986) e não foi encontrada em *H. pectinata* ou *H. suaveolens* (BASÍLIO *et al.*, 2006), nem em *H. stricta*.

Diferentes tipos de tricomas glandulares foram descritos em vários gêneros de Lamiaceae como *Hyptidendron* (FIUZA *et al.*, 2010), *Plectranthus* (DUARTE, LOPES, 2007; MILANEZE-GUTIERRE *et al.*, 2007; MAURO *et al.*, 2008), *Mentha* (MARTINS, 2002) e *Salvia* (SIEBERT, 2004). Esta característica se confirma em *Hyptis*, que apresenta tricomas glandulares capitados curtos nas seções *Pachyphyllae* e *Eriosphaeria* e em *H. pectinata*, e capitados longos em *H. suaveolens* (RUDALL, 1986; BASÍLIO *et al.*, 2006), enquanto em *H. stricta* foram encontrados tricomas glandulares peltados, capitados curtos e longos.

Diversos autores descreveram a variação na forma dos tricomas tectores (RUDALL, 1986; MARTINS, 2002; BASÍLIO *et al.*, 2006; DUARTE, LOPES, 2007; MILANEZE-GUTIERRE *et al.*, 2007; MAURO *et al.*, 2008; FIUZA *et al.*, 2010). A ornamentação nos tricomas unicelulares e na última célula dos tricomas pluricelulares encontrada em *H. stricta* foi observada também em *Mentha spicata* L. (MARTINS, 2002). Essa característica morfológica dos tricomas tectores foi o primeiro relato observado em *Hyptis*. A distribuição e frequência dos tricomas maiores na face abaxial de *H. stricta* também foram verificados em *H. pectinata* e em *H. suaveolens* (BASÍLIO *et al.*, 2006).

Em *H. stricta* os estômatos são diacíticos encontrados, os mesmos citados para *H. pectinata* e *H. suaveolens* por Basílio *et al.* (2006). A distribuição anfiestomática de *H. stricta* também é observada em algumas espécies da seção *Eriosphaeria* (RUDALL, 1986) e em *H. suaveolens* (BASÍLIO *et al.*, 2006), enquanto que na seção *Pachyphyllae*, em algumas espécies da seção *Eriosphaeria* (RUDALL, 1986) e em *H. pectinata* (BASÍLIO *et al.*, 2006) é hipoestomática.

O mesofilo dorsiventral é característico em *Hyptis*. Nas seções *Pachyphyllae* e *Eriosphaeria*, o mesofilo é constituído por uma camada de parênquima paliçádico e 1-3 camadas de parênquima esponjoso (RUDALL, 1986). Na seção *Mesosphaeria*

há uma camada de parênquima paliçádico e o parênquima esponjoso apresenta 5-6 camadas em *H. pectinata* e 6-7 camadas em *H. suaveolens* (BASÍLIO *et al.*, 2006), enquanto em *H. stricta* apresenta 4-5 camadas. A estratificação do parênquima esponjoso não permite separar as três espécies estudadas dentro da seção *Mesosphaeria*, mas permite separar esta seção das seções estudadas por Rudall (1986).

A nervura central nas seções *Pachyphyllae* e *Eriosphaeria* forma um arco médio de 1-2 feixes auxiliares (RUDALL, 1986). Em *H. pectinata* e em *H. suaveolens* é em arco com dois feixes auxiliares voltados para a face adaxial, enquanto em *H. stricta* é formada por um único feixe distribuído em arco colateral. Em *H. pectinata* o xilema é intercalado por parênquima e o colênquima é 3-4 seriado, em *H. suaveolens* o colênquima é 5 seriado (BASÍLIO *et al.*, 2006), comparativamente diferente de *H. stricta*, que é 5-8 seriado.

Hyptis stricta apresenta pecíolo côncavo-convexo, assim como *H. pectinata* e *H. suaveolens*. Os feixes vasculares apresentam-se em arco com dois feixes auxiliares tanto em *H. stricta* quanto em *H. suaveolens*, diferente de *H. pectinata* em que a disposição dos seis feixes é circular. Ambas as espécies apresentam células esclerenquimáticas no pecíolo (BASÍLIO *et al.*, 2006), diferente de *H. stricta*.

Os caracteres anatômicos da família Lamiaceae como estômatos diacíticos, mesofilo dorsiventral e caules quadrangulares em secção transversal, com uma camada subepidérmica de colênquima restrito aos ângulos (METCALFE, 1988; THEOBALD, KRAHULIK e ROLLINS, 1988; HARLEY *et al.*, 2004) estão presentes em *H. stricta*.

As paredes anticlinais da epiderme, o tipo e distribuição de estômatos na epiderme e a vascularização da nervura central e do pecíolo são caracteres comuns para espécies da seção *Mesosphaeria*.

Quanto à identificação molecular, a sequência de 827 obtida para a região *matK* e a sequência de 660 bases obtida para a região *rbcL* estão de acordo com os *amplicons* obtidos por outros autores para essas regiões (HOLLINGSWORTH, GRAHAM, LITTLE, 2011), inclusive em estudos com plantas pertencentes à família Lamiaceae (GUO *et al.*, 2011; MATTIA *et al.*, 2011).

Na pesquisa realizada no Genbank não foram encontradas sequências depositadas com as regiões *matK* e *rbcL* de *Hyptis* para estabelecer a comparação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Morfologicamente, os caracteres diagnósticos para *Hyptis stricta* são o aspecto geral da inflorescência, o número de flores por verticilastro, o comprimento das brácteas involucrais e o número de tecas.

Anatomicamente, a distribuição dos estômatos e as peculiaridades dos feixes vasculares da nervura central e do pecíolo são caracteres importantes para a distinção das espécies da mesma seção já estudadas.

Em relação aos testes microquímicos, *H. stricta* está de acordo com os estudos para a família Lamiaceae.

De acordo com o CBOL (2009), a amplificação e o sequenciamento das regiões *matK* e *rbcL* foram realizadas com sucesso, e correspondem ao código de barras para *H. stricta*.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas de oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Nutrire**, v. 35, n. 1, p.129-148, 2010.
- ALARCON-AGUILAR, F. J. *et al.* Investigation on the hypoglycemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. **Phytotherapy Research**, n. 16, p.383-386, 2002.
- ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search toll. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410, 1990.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Antonociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. Lamiaceae genotypes. **Phytomedicine**, n. 15, p.334-339, 2008.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p.298-303, 2005.
- AZEREDO, A. M. L. O código de barras da vida baseado no DNA "Barcoding of Life": Considerações e perspectivas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005. Disponível em: <http://www.cria.org.br/cgee/col/documentos>. Acesso em: 10 ago. 2010.
- AZEVEDO, N. R. *et al.* Chemical variability in essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, n. 57, p.733-736, 2001.
- BASÍLIO, I. J. L. D. *et al.* Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p.518-525, 2006.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1, 305p.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976. p. 121, 276.
- BISPO, M. D. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p.81-86, 2001.
- BOALINO, D. M. *et al.* α -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p.1303-1307, 2003.
- BUENO, A. X. *et al.* Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p.317-323, 2006.

- CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: status and classification. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae science**, p.511-522, 1992.
- CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p.12794-12797, 2009.
- CBOL Plant Working Group. Final definitions of data standards for plant barcodes await the decision by CBOL on which loci will have official barcode status. Disponível em: < <http://www.barcoding.si.edu/pdf/informationonbarcode loci.pdf>>, acesso em 01/06/2011.
- CHASE, M. W.; FAY, M. F. Barcoding of plants and fungi. **Science**, v. 325, p.682-683, 2009.
- CHASE, M. W. *et al.* Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of de Royal Society Biological Sciences**, v. 360, p.1889-1895, 2005.
- CHUKWUJEKWU, J. C. *et al.* Antiplasmodial diterpenoid from de leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p.295-297, 2005.
- DÔRES, R. G. R. Análise morfológica e fitoquímica de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). 374 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p.13-15, 1990.
- DUARTE, M. R.; LOPES, J. F. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p.549-556, 2007.
- EPLING, C. Revisión del género *Hyptis* (Labiatae). **Revisa del Museo de La Plata (Bot.)**, n. 7, p.153-497, 1949.
- FALCÃO, D. Q. Estudo químico e farmacológico de quatro espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. 178 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p.69-74, 2003.
- FAY, M. F. *et al.* Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). **Kew Bulletin**, v. 52, p.111-120, 1997.
- FIUZA, T. S. *et al.* Estudos das folhas e caule de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley, Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p.192-200, 2010.

FORD, C. S. *et al.* Selection of candidate DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p.1-11, 2009.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. p. 218.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Gauthier-Villars, Paris, v. 1, 1969.

GUO, X. *et al.* DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p.1198-1203, 2011.

HARLEY, R. M. Labiadas – 1 *Hyptis*. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, 1985, 72p.

HARLEY, R. M. *et al.* Labiatae. *In*: KUBITZKI, K.; KADEREIT, J. W. **Flowering Plants, dicotyledones: Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae. The families and genera of vascular plants; 7**. Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004, 484p.

HARLEY, R., FRANÇA, F.; SANTOS, E. P., SANTOS, J. S. **Lamiaceae in lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB08183>>. Acesso em 20/06/2010.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 270, p.313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p.852-859, 2005.

HICKEY, L. J. A revised classification of the architecture of dycotyledonous leaves. *In*: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dycotoledones**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1988, 276p, v. 1

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a blunt DNA barcode. **PLoS One**, v. 6, n. 5, E19254, doi:10.1371journal.pone.0019254, 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. p.41, 193.

JO, O.; LA, O.; EO, O. Insecticidal potency of *Hyptis spicigera* preparations against *Sitophilus zeamais* (L.) and *Tribolium castaneum* (herbst) on stored maize grains. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p.187-192, 2009.

JUHÁS, S. *et al.* Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia Biologica (Praha)**, n. 54, p.1-7, 2008.

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

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLoS One** v. 2, n. 6, e508, 2007.

KRESS, W. J.; ERIKSON, D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 8, p.2761-2762, 2008.

KRESS, W. J. *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p.8369-8374, 2005.

LADAN, Z. *et al.* Antimicrobial potency of *Hyptis spicigera* leaf extracts against some pathogenic microorganisms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 11, p.905-908, 2009.

LIMA, C. F. *et al.* Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention? **British Journal of Nutrition**, n. 96, p.326-333, 2006.

LUSA, M. G. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthaginenses* (Jacq.) J.F. MACBR. (Lythraceae) e avaliação em ambientes hidrofítico e mesofítico. 62 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MATTIA, F. *et al.* A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. **Food Research International**, v. 44, p.693-702, 2011.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1203-1209, 2006.

MARTINS, M. B. G. Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata x suaveolens* (Lamiaceae). **Bragantia**, v. 61, n. 3, p.205-218, 2002.

MATOS, M. E. R. Contribuição ao estudo da nervação foliar de plantas dos Cerrados Labiatae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p.23-27, 1969.

MAURO, C. *et al.* Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p.608-613, 2008.

- MAYER, B. *et al.* Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. **Fitoterapia**, v. 80, p.421-426, 2009.
- MELO, G. B. *et al.* Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 5, p.949-954, 2005.
- MELO, G. B. *et al.* Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 1, p.33-36, 2006.
- METCALFE, C. R. Some basic types of cells and tissues. *In*: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1988, 276p, v. 1.
- MILANEZE-GUTIERRE, M. A. *et al.* Caracterização morfológica dos tricomas foliares e caulinares de duas espécies de Lamiaceae conhecidas como “falso boldo”. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p.125-130, 2007.
- MONKS, N. R. *et al.* Anti-tumour screening of Brazilian plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 8, p.603-616, 2002.
- MOREIRA, A. C. P. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.28-33, 2010.
- NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, p.485-489, 2008.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p.368-73, 1964.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1997. p.13-17.
- PASTORE, J. F. B. *et al.* Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, v. 60, n. 5, p.1317-1329, 2011.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; TUBBLEBINE, W. H., SHEPHERD, G. Variação de terpenos em *Hyptis suaveolens* e seu papel na defesa contra herbívoros. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p.217-235, 1995.
- RUDALL, P. Leaf anatomy of *Hyptis* sect. *Pachyphyllae* (Labiatae) and related species. **Kew Bulletin**, v. 41, p.1017-1025, 1986.
- SANTOS, P. O. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1648-1652, 2008.

- SANTOS, T. C. *et al.* Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, v. 78, p.333-336, 2007.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951. p.97.
- SIEBERT, D. J. Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. **Annals of Botany**, v. 93, p.763-771, 2004.
- SILVA, R. L. *et al.* Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, p.101-105, 2002.
- SILVA, W. B. O lugar da farmacognosia na formação em farmácia: questões epistemológicas e suas implicações para o ensino. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p.289-294, 2010.
- SILVA, W. J. *et al.* Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3251-3255, 2008.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p.435-440, 2010.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p.233-241, 1996.
- STEARN, W. T. **Botanical Latin**. 3. ed. rev. London: David & Charles, 1983.
- THEOBALD, W. L.; KRAHULIK, J. L.; ROLLINS, R. C. Trichome description and classification. *In*: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1988, 276p, v. 1.