

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Rizia Rodrigues Santos

Germoplasma de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*: morfologia, fenologia e fitoquímica

**Montes Claros
2019**

Rizia Rodrigues Santos

Germoplasma de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*: morfologia, fenologia e fitoquímica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Ernane Ronie Martins

Montes Claros
Agosto de 2019

Santos, Rizia Rodrigues.

S237g
2019 Germoplasma de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*:
morfologia, fenologia e fitoquímica / Rizia Rodrigues Santos. Montes Claros,
2019.

73 f. : il.

Tese (Doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal.
Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

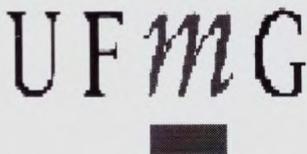
Banca examinadora: Prof.^a Lourdes Silva de Figueiredo, Prof.^a Yule
Roberta Ferreira Nunes, Prof.^a Francine Alves da Fonseca, Prof.^a Jordany
Aparecida de Oliveira Gomes.

Inclui referências: f. 12-15, 41-45, 61-65.

1. Plantas medicinais. 2. Morfologia vegetal. 3. Marcadores biológicos.
IV. Plantas -- melhoramento genético. V. Fenologia vegetal. I. Martins,
Ernane Ronie (Orientador). II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.52

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG
Josiel Machado Santos – CRB-6/2577



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 23 dias do mês de agosto de 2019, às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Ernane Ronie Martins, D. Sc. (ICA/UFMG) e com a participação das Professoras Lourdes Silva de Figueiredo, D. Sc. (ICA/UFMG) e Yule Roberta Ferreira Nunes, D. Sc. (Unimontes), da Técnica de Laboratório Francine Souza Alves da Fonseca, D. SC. (ICA/UFMG) e da Pós-Doutoranda Jordany Aparecida de Oliveira Gomes, D. Sc. (Unesp), reuniu-se a Banca de tese de **RIZIA RODRIGUES SANTOS**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Geomorfologia de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subulatus*: morfologia, fenologia e fitoquímica."

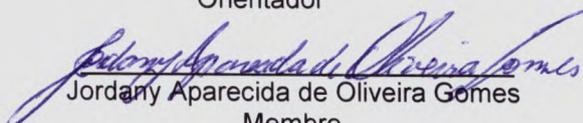
foi expresso pelo conceito "A", sendo a aluna considerada (aprovado/reprovado) APROVADO. E, para constar, eu, Professor Ernane Ronie Martins, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

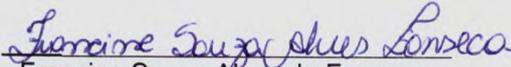
OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 68** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

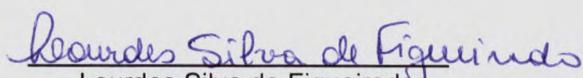
Art. 68 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, 4 (quatro) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

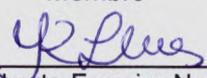
Montes Claros, 23 de agosto de 2019.


Ernane Ronie Martins
Orientador


Jordany Aparecida de Oliveira Gomes
Membro


Francine Souza Alves da Fonseca
Membro


Lourdes Silva de Figueiredo
Membro


Yule Roberta Ferreira Nunes
Membro

Rizia Rodrigues Santos

Germoplasma de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*: morfologia, fenologia e fitoquímica

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Lourdes Silva de Figueiredo D. Sc
ICA/UFMG

Prof. Yule Roberta Ferreira Nunes
D. Sc. Unimontes

Prof. Francine Alves da Fonseca
D. Sc. ICA/UFMG

Jordany Aparecida de Oliveira Gomes
D. Sc. Unesp



Prof. Ernane Ronie Martins (orientador)
D. Sc. ICA/UFMG

Montes Claros, 23 de agosto de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, meus pais, amigos e familiares, com muito amor.

AGRADECIMENTO

“Ebenézer, até aqui nos ajudou o SENHOR.” (1 Samuel 7:12). Não há como começar os agradecimentos sem me referir a este versículo, pois até aqui o Senhor tem me ajudado. Sou grata ao meu bondoso Deus, por mais um ciclo que se finda em minha vida acadêmica. Assim como nos demais, Ele me sustentou, sem Ele não haveria conseguido.

Agradeço ao professor Ernane, não só pela orientação, mas amizade e confiança depositados em mim ao longo desses dez anos. Em muitos momentos, duvidei que eu era capaz, mas ele sempre acreditou no meu potencial. Muito obrigada!

À professora Francine, pelos ensinamentos laboratoriais e de vida, que com toda certeza, levarei comigo. Também, aos colegas de laboratório Karol, Thaíse, Ana Paula, Gaby Brayonn e Iago, que tornaram a rotina mais leve, transformando tudo em motivo de festa (gordices! kkkk).

Aos professores Alcinei Místico, Cristina Nascimento e Rúbia Fonseca, pela colaboração e auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

À minha família, em especial, aos meus pais, Joel e Tânia, por todo amor, por serem a base e porto seguro em todos os momentos da minha vida, amo vocês.

Aos meus amigos Giovanni, Gislane, Jordany, Giovanna e Pedro por todo apoio, incentivo e orações, que foram fundamentais ao longo dessa jornada.

A todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, colaboraram com a concretização deste trabalho. Muito obrigada! Deus vos abençoe!

EPÍGRAFE

*“Se em sua vida falta a felicidade
Pegue a estrada e comece a procurar
E nessa estrada uma porta se abrirá
Felicidade em sua vida entrará*

*Felicidade só se tem quando se planta
A vida é bela e pode te fazer sorrir
Se cada um fizer a sua parte
Na caminhada aprenderá a ser feliz*

*De manhã cedo quanto tu se levantar
Confia em Deus que Ele vai te ajudar
Pegue o arado e comece a trabalhar
Felicidade em sua vida entrará”*

Ubaldo Almeida

GERMOPLASMA DE *ECHINODORUS FLORIBUNDUS* E *ECHINODORUS SUBALATUS*: MORFOLOGIA, FENOLOGIA E FITOQUÍMICA

RESUMO

O chapéu-de-couro é nome popular dado às plantas do gênero *Echinodorus*, pertencentes à família Alismataceae, que são amplamente utilizadas na medicina popular, como diurética e anti-inflamatória. As espécies *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus* têm seu uso assegurado pela Farmacopeia Brasileira. Porém, devido às dificuldades de identificação, outras plantas do gênero, tais como *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*, têm sido utilizadas pela população com relatos de resultados eficazes. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização de duas espécies de chapéu-de-couro (*Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*) utilizadas para fins medicinais. Para isso, foram coletados acessos das duas espécies para a formação de coleção de germoplasma em casa de vegetação. Foram realizadas análises de caracterização morfológica, caracterização química de compostos voláteis e fenologia. Foi realizada a caracterização química dos extratos por triagem fitoquímica, estudo de marcadores químicos descritos em *Echinodorus*, quantificação total de fenóis e flavonoides e determinação dos teores de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico. Os descritores limbo foliar, ápice e base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar mostraram-se eficientes na diferenciação entre as duas espécies. Quimicamente, *E. floribundus* e *E. subalatus* foram similares a *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* devido à presença dos compostos (*Z*)-beta-cariofileno e (*E*)-beta-cariofileno. Foi observada diversidade entre acessos para *E. floribundus* e *E. subalatus*. Apesar da produção de folhas maduras contínuas, ambas as espécies apresentaram período de senescência foliar acentuado, comum entre as espécies do gênero. O ciclo de floração das espécies estudadas é similar ao das espécies de *Echinodorus* descritas na literatura. A triagem fitoquímica revelou presença de fenóis, flavonoides, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e triterpenoides nos extratos. Porém, ambas as espécies apresentaram valores inferiores de flavonoides e fenóis totais quando comparadas com outras espécies do gênero descritas na literatura. A caracterização do extrato aquoso foliar em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) detectou 118 e 121 compostos em *E. floribundus* e *E. subalatus*, respectivamente. Destes, 25 apresentaram espectros UV-Vis característicos de compostos fenólicos. Não foram detectados os marcadores ácido chicórico e isoorientin, comuns em *Echinodorus*. Os teores de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico para *E. floribundus* e *E. subalatus* (5,52% e 3,07%, respectivamente) foram superiores ao que é exigido pela Farmacopeia Brasileira. Através dos resultados, pode-se concluir que há similaridade química e fenológica das espécies estudadas com as descritas na literatura, porém ocorrem variações interespecíficas no perfil químico de voláteis e em alguns descritores morfológicos, sendo recomendada a utilização apenas dos descritores limbo foliar, ápice e

base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar para diferenciação entre as duas espécies. *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* possuem flavonoides e fenóis em menores concentrações do que as espécies de *Echinodorus* descritas na literatura e há similaridade das espécies estudadas com as descritas pela Farmacopeia Brasileira, com potencial uso medicinal.

Palavras-chave: Planta medicinal. Descritores morfológicos. Marcadores químicos. Estudo fenológico. Farmacopeia Brasileira.

**ECHINODORUS FLORIBUNDUS AND ECHINODORUS SUBALATUS GERMOPLASM:
MORPHOLOGY, PHENOLOGY AND PHYTOCHEMISTRY**

ABSTRACT

The “chapéu-de-couro” is a popular name given to plants of the genus *Echinodorus*, belonging to the Alismataceae family, which are widely used in folk medicine as diuretics and anti-inflammatory. The species *Echinodorus grandiflorus* and *Echinodorus macrophyllus* have their use assured by the Brazilian Pharmacopoeia. However, due to identification difficulties, other plants of the genus, such as *Echinodorus floribundus* and *Echinodorus subalatus*, are used by the population with reports of effective results. The aim of the work was to characterize two species of “chapéu-de-couro” (*Echinodorus floribundus* and *Echinodorus subalatus*) used for medicinal purposes. For this, accessions of the two species were collected for the formation of germplasm collection in a greenhouse. Morphological characterization, chemical characterization of volatile compounds and phenology analyzes were performed. The chemical characterization of the extracts was performed by phytochemical screening, study of chemical markers described in *Echinodorus*, total quantification of phenols and flavonoids and determination of the levels of *o*-hydroxycinnamic acid derivatives. The descriptors leaf limb, leaf limb apex and base, leaf hairiness and leaf petiole hairiness were efficient in differentiating between the two species. Chemically, *E. floribundus* and *E. subalatus* were similar to *E. grandiflorus* and *E. macrophyllus*, due to the presence of (*Z*)-beta-caryophyllene and (*E*)-beta-caryophyllene compounds. Diversity between accessions for *E. floribundus* and *E. subalatus* was observed. Despite the production of continuous mature leaves, both species presented a period of accented leaf senescence, usual in the species of the genus. The flowering cycle of the studied species is similar to that of the *Echinodorus* species described in the literature. Phytochemical screening revealed the presence of phenols, flavonoids, flavones, xanthenes, steroids and triterpenoids in the extracts. However, both species presented lower values of flavonoids and total phenols when compared with other species of the genus described in the literature. The characterization of aqueous leaf extract in high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) detected 118 and 121 compounds in *E. floribundus* and *E. subalatus*, respectively. Of these, 25 showed characteristic UV-Vis spectra of phenolic compounds. Markers chicory acid and isoorientin, present in *Echinodorus*, weren't detected. The levels of *o*-hydroxycinnamic acid derivatives for *E. floribundus* and *E. subalatus* (5.52% and 3.07%, respectively) were higher than required by the Brazilian Pharmacopoeia. From the results, there are chemical and phenological similarities between the species studied and those described in the literature. However, there are interspecific variations in the chemical profile of volatiles and in some morphological descriptors. The descriptors leaf limb shape, leaf limb apex and base, leaf hairiness and petiole hairiness are recommended for differentiation of the two species. *E. floribundus* and *E. subalatus*

have lower flavonoids and phenols than *Echinodorus* species described in the literature and there is similarity between the species studied and those described by the Brazilian Pharmacopoeia, with potential medicinal use.

Keywords: Medicinal plant. Morphological descriptors. Chemical markers. Phenological study. Brazilian Pharmacopoeia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4. ARTIGOS.....	16
4.1. Artigo 1 - Diversidade em <i>Echinodorus floribundus</i> (Seub.) Seub. e <i>Echinodorus subalatus</i> (Mart.) Griseb.: descritores e fenologia	16
4.2. Artigo 2 – Marcadores químicos em espécies de <i>Echinodorus</i> (Alismataceae) utilizadas como chapéu-de-couro	46
5. CONCLUSÕES/ CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Espécies aquáticas pertencentes à família Alismataceae, conhecidas popularmente como chapéu-de-couro (*Echinodorus* sp.), predominantemente encontradas na região tropical da América do Sul, possuem ampla distribuição no território brasileiro, em lagoas temporais, depressões úmidas, pântanos, savanas e planícies inundadas (LEHTONEN, 2008). De grande importância para a indústria alimentícia nacional, são utilizadas como matéria-prima no preparo de refrigerantes (LIMA-DELLAMORA *et al.*, 2014). Apresentam-se eficientes na fitorremediação de chumbo, que é tóxico em concentrações muito baixas, podendo, assim, serem utilizadas na descontaminação de aquíferos poluídos (BARBOSA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2015). No setor de ornamentação, são utilizadas na decoração de aquários e lagos (BRUNEL, 2009). Possuem ainda expressão na medicina popular, com o uso diurético, hipotensivo, hiperlipidêmico, anti-inflamatório e analgésico (BOLSON *et al.*, 2015).

Alguns compostos, como diterpenos clerodânicos, cembrânicos e labidânicos, alcaloides, glicosídeos, óleos essenciais, saponinas, flavonoides, ácido trans-acônítico, ácido o-hidroxinâmico e seus derivados já foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* (KOBAYASHI *et al.*, 200, LOPES *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2016b). Os flavonoides são correlacionados como responsáveis, ou em sinergia com outros compostos, às propriedades diuréticas, antineoplásica tumoral, anti-inflamatória e protetora a lesões renais comprovadas para as espécies *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*. No Brasil, a Farmacopeia Brasileira estabelece os parâmetros mínimos para a comercialização da droga vegetal do chapéu-de-couro, tais como as características organolépticas, material estranho, umidade, cinzas e doseamento de derivados hidroxicinâmicos. Existem ainda, pedidos de patentes de formulações de remédios com o extrato dessas espécies. Sabe-se, porém, que outras espécies do gênero, além das que tiveram ações biológicas comprovadas, estão sendo utilizadas pela população que relatam sua eficácia.

Um dos maiores entraves apresentados pelo gênero *Echinodorus* é a dificuldade de identificação precisa das espécies, advinda da plasticidade fenotípica que essas apresentam, associada à baixa quantidade de descritores morfológicos convergentes (LEHTONE; MYLLYS, 2008). Comumente, é possível encontrar literaturas que divergem quanto ao número de espécies do gênero *Echinodorus*. Ligado a isso, tem-se, como forma de obtenção do chapéu-de-couro para suprir a demanda do mercado, a prática do extrativismo, que por sua vez, pode implicar na depredação de populações naturais, quando não são realizadas práticas sustentáveis. O extrativismo, associado ao avanço da urbanização nos locais de ocorrência natural dessas plantas e as alterações climáticas constantes compõe um panorama de risco à diversidade dessas espécies.

Assim, o estudo da diversidade e da utilização de marcadores que ajudem a distinguir com maior precisão as espécies do gênero são importantes. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização de espécies de chapéu-de-couro (*Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*).

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Caracterizar duas espécies de chapéu-de-couro (*Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*) utilizadas para fins medicinais.

Objetivos Específicos

- Estabelecer coleção de germoplasma com acessos de duas espécies de chapéu-de-couro;
- Descrever a morfologia das espécies;
- Avaliar padrões fenológicos;
- Analisar o padrão de ocorrência dos compostos voláteis e dos descritores morfológicos a fim de contribuir com informações de descritores taxonômicos para diferenciação das espécies;
- Analisar a composição química a fim de obter marcadores químicos que ajudem na identificação das espécies;
- Avaliar a similaridade química entre as espécies estudadas com as espécies descritas pela Farmacopeia Brasileira.

3. REVISÃO DE LITERATURA

“Chapéu-de-couro” é o nome vulgar dado às espécies *Echinodorus* sp., pertencentes à família Alismataceae e com grande utilização na medicina popular (PORTELLA *et al.*, 2012). Outras denominações também são atribuídas a essas espécies, como “chá-mineiro”, “erva-de-pântano”, “erva-de-bugre”, “congonha-do-brejo” e “erva-do-brejo” (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Das espécies comumente encontradas na literatura, tem-se *Echinodorus floribundus*, *Echinodorus grandiflorus*, *Echinodorus longipetalus*, *Echinodorus macrophyllus* e *Echinodorus subalatus*. Essas estão distribuídas por toda América Latina, inclusive no Brasil, com registro das espécies *E. floribundus* e *E. grandiflorus* distribuída por todo território brasileiro, desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul; *E. macrophyllus* nos estados de Santa Catarina e São Paulo; *E. longipetalus* no estado de São Paulo, e *E. subalatus* nas regiões Nordeste e Centro-Oeste brasileiro (RATAJ, 1969; CROW, 1993; PANSARIN; AMARAL, 2005; LEHTONEN, 2008; PANSARIN, 2008; DA SILVA; BASTOS; TAKAHASHI, 2010; TABOSA; MATIAS; MARTINS, 2012; MORO; DE SOUSA; MATIAS, 2014; OLIVEIRA; BOVE, 2016). São encontradas em lagoas temporais e depressões úmidas, em savanas e planícies inundadas, em pântanos, ao longo das margens dos lagos (LEHTONEN, 2008) e estão associadas a locais que apresentam elevada intensidade luminosa e com alta disponibilidade de nutrientes (DUARTE *et al.*, 2015).

As folhas do chapéu-de-couro são tradicionalmente utilizadas devido às propriedades diurética, hipotensiva, hiperlipidêmica, hepatites, reumatismos, anti-inflamatória e analgésica (KOBAYASHI *et al.*, 2000b; BOLSON *et al.*, 2015). No Brasil, foi publicado um pedido de patente para composição farmacêutica contendo os ácidos cis e, ou, *trans*-aconítico obtidos de folhas de *E. grandiflorus* para o tratamento de artrite reumatoide e osteoartrite (INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL, 2014). A Farmacopeia Brasileira (2019) estabelece que a droga vegetal de chapéu-de-couro deve ser constituída das folhas secas, com 2,8% de derivados do ácido hidroxicinâmico (expressos em verbacosídeo), possuir odor característico e sabor amargo e ser da espécie *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli, porém o gênero é composto por mais 27 espécies, que ao longo dos anos apresentam problemas nomenclaturais e sinonímicos (LEHTONEN, 2008).

Além do uso medicinal, grande parte das plantas pertencente ao gênero *Echinodorus* são empregadas como ornamentais (LEHTONEN, 2016). Essas espécies também são de importância para a indústria alimentícia, no preparo de refrigerantes (LIMA-DELLAMORA *et al.*, 2014), são eficientes na fitorremediação de chumbo a níveis de traços, retendo este elemento em suas raízes (BARBOSA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2015) e podem possuir potencial para serem utilizadas na descontaminação de aquíferos poluídos (YING; LEI, 2014; WAN-RU, 2014).

O chapéu-de-couro que abastece o mercado brasileiro é obtido exclusivamente por extrativismo, o que ameaça as populações da espécie e não garante a qualidade química do produto. Conhecer a fenologia das espécies de chapéu-de-couro e sua diversidade química são aspectos importantes para traçar estratégias de manejo e utilização adequada.

Por se tratar de uma planta de ambiente úmido, está propensa aos impactos das modificações climáticas, que podem ocasionar alterações fenológicas e deslocamento populacional em relação à latitude e longitude, alterando a distribuição dessas plantas, ou até mesmo, extinguindo alguns locais de ocorrência populacional (ARAÚJO *et al.*, 2012). Alterações em espécies aquáticas já têm sido observadas em

resposta às mudanças climáticas (IPCC, 2014).

A espécie *Echinodorus grandiflorus* é caracterizada por Rataj (1969) pelas folhas coriáceas ovaladas, com comprimento médio de 38 cm, largura de aproximadamente 35 cm e limbo com pontuações translúcidas; possui pecíolo áspero, com comprimento 2 a 3 vezes maior do que o limbo foliar; inflorescência paniculada com 6 a 12 verticilos, flores de pétalas brancas, raramente de cor rosa ou amarela, com diâmetro de 2,5 a 3,5 cm e fruto seco do tipo aquênio.

As folhas da *Echinodorus macrophyllus* são sempre emersas, com pecíolo cilíndrico que mede de 31 a 52 cm de comprimento, limbo foliar de 18 a 24 cm de comprimento e 9,7 a 21,5 cm de largura, do tipo oval ou raramente oval-lanceolada, de ápice obtuso a agudo, base cordada a truncada, com 7 a 13 nervuras e pontuações translúcidas ausentes; sua inflorescência é do tipo panícula, com 3 a 15 flores brancas e frutos do tipo aquênio (PARSIN; AMARAL, 2005).

Echinodorus subalatus (Mart.) Griseb (sinonímia *Sagittaria palifolia* var. *subalata* (Mart.) Kuntze) é uma espécie perene, rizomatosa, com folhas que na maior parte permanecem emersas, de forma elíptica a ovalada, com linhas transparentes (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 1986). O pecíolo foliar apresenta formato triangular a hexagonal, com superfície que pode variar entre levemente ondulada, irregular ou com extensões aladas caniculadas, quando próximas umas das outras, com epiderme composta por células tabulares com paredes finas, com estômatos localizados no mesmo nível das outras células epidérmicas (MATIAS; SOARES; SCATENA, 2007).

Apresenta inflorescências do tipo panícula e frutos com menos de um terço do corpo frutífero (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 1986). O escapo (haste floral) de *E. subalatus* em corte transversal possui formato oblato, epiderme uni seriada composta por células tabulares de paredes finas, com córtex e cilindros vasculares diferenciados (MATIAS; SOARES; SCATENA, 2008). Possui expansões aladas curtas com dois feixes vasculares colaterais, que são circundados por endoderme contínua (bainha externa) e periciclo (bainha interna), podendo ocorrer em mais de uma camada (MATIAS; SOARES; SCATENA, 2008). As células estomatais estão localizadas no mesmo nível das outras células epidérmicas, distribuídas entre os feixes vasculares entre o clorênquima que se situa imediatamente sob a epiderme, também apresenta ductos laticíferos presentes tanto no córtex quanto no cilindro vascular (MATIAS; SOARES; SCATENA, 2008). Os feixes vasculares ocorrem em uma posição mais distante da epiderme, sob três a cinco camadas de clorênquima. O aerênquima é encontrado nas camadas internas do córtex, no cilindro vascular e na medula (MATIAS; SOARES; SCATENA, 2008).

Echinodorus floribundus (Seub.) Seub. (sinonímio *Echinodorus grandiflorus* ssp. *floribundus* (Seub.) Micheli) é uma planta aquática herbácea, perene, que mede entre 1,5 a 2 m de altura (SILVA; BASTOS; TAKAHASHI, 2010). De acordo com Lehtonen (2008), possui rizomas horizontais, folhas emersas de lâminas largas e compridas, que podem medir de 20 a 40 cm de comprimento e 16 a 40 cm de largura. O limbo foliar é do tipo ovado, de ápice retuso para obtuso e base cordada, apresenta pontos transparentes, raramente ausentes, com 7 a 11 nervuras e o pecíolo apresenta bainha na base até 22 cm de comprimento, é pubescente estrelado, podendo medir 90 cm de comprimento, 0,5 a 2,5 cm de diâmetro (LEHTONEN, 2008).

A inflorescência é do tipo panícula, de 8-16 níveis espirais com 7–18 flores, ereta, que ultrapassa as folhas, podendo, ocasionalmente, atingir 120 cm comprimento e 70 cm de largura, apresenta raques e pedúnculo com bainha, pubescente estrelada, com ápice acuminado e pedicelos espalhando em flor e

fruto (LEHTONEN, 2008). Suas flores medem aproximadamente 4 cm diâmetro, com sépalas eretas com 12 a 19 nervuras sem papilas, de 7 mm de comprimento e 5 mm de largura (LEHTONEN, 2008). As pétalas são brancas, sem garras e sobrepostas, medem 20 mm de comprimento e 18 mm de largura, a flor apresenta de 24–30 estames, anteras versáteis de 1,5 mm de comprimento, filamentos de 3 mm de comprimento e carpelos numerosos (LEHTONEN, 2008). Os frutos são oblanceolóides, com 2-3 glândulas alongadas e bico menor que 5 mm de comprimento, podem medir de 1,8-2,8 mm de comprimento, 1 mm de largura (LEHTONEN, 2008).

Echinodorus floribundus possui hábito de crescimento semelhante ao da *E. glandulosus*, porém elas se diferenciam nas folhas, sendo que *E. floribundus* tem folhas cordiformes com pontuações translúcidas, já *E. glandulosus* apresenta retículo translúcido nas folhas (MATIAS; SOUSA, 2011). *Echinodorus glandulosus* apresenta flores com apenas 12 estames, já *E. floribundus* possui flores com número mais elevado (MATIAS; SOUSA, 2011). Pode ser confundida com as espécies *E. palaefolius* e *E. pubescens*, devido ao hábito de crescimento semelhante, porém por possuir folhas glabras à glabrescentes, o que o diferencia da espécie *E. pubescens* são as alas estreitas na inflorescência; e o escapo semicircular o diferencia da espécie *E. palaefolius* (MATIAS; SOUSA, 2011).

As espécies do gênero *Echinodorus* são adaptadas morfológicamente a condições de alagamento, apresentando raízes com uma única camada de células com fina camada de cutícula, canais de ar dispostos em transversal à superfície de todos os órgãos, classificadas como plantas hidrófitas emergentes (LEITE; FRANÇA; SCATENA, 2012; TABOSA; MATIAS; MARTINS, 2012; MORO; DE SOUSA; MATIAS, 2014). Podem ser de ocorrência frequente (FERREIRA *et al.*, 2015) ou esporádica, que aparece e desaparece sem regularidade de modo efêmero (TABOSA; MATIAS; MARTINS, 2012; MORO; SOUSA; MATIAS, 2014).

Apesar do destaque que as espécies de chapéu-de-couro possuem, devido suas propriedades medicinais, há poucos estudos sobre fenologia, com fins de conservação e melhor aproveitamento das espécies (BEVILAQUA *et al.*, 2001). A espécie *Echinodorus rostratus* produz até sete panículas por planta, com flores perfeitas, sua floração é considerada precoce quando comparada às espécies *Sagittaria* perenes, que florescem no final do verão (KAUL, 1985). Já a espécie *E. grandiflorus* floresce no período do verão e utiliza néctar e pólen como recurso atrativo, porém as abelhas polinizadoras (sociais e solitárias) coletam apenas o néctar, em visitas que acontecem do momento da abertura floral até o fenecimento (PANSARIN; PANSARIN, 2011). As abelhas *Protodiscelis echinodori* (Colletidae) são as principais coletoras de pólen, com comportamento oligolético de forrageamento, e coletam apenas de espécies do gênero *Echinodorus* (VIEIRA; LIMA, 1997). As flores de *E. longipetalus* são polinizadas por várias espécies de Hymenoptera, principalmente por *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *suspecta* Moure e Camargo (PANSARIN, 2008). Para a espécie *E. subalatus*, a principal abelha polinizadora de *E. subalatus* é *Protodiscelis alismatis* (CARVALHO; SCHLINDWEIN, 2011), endêmica da caatinga brasileira e, aparentemente, oligoléticas em *Echinodorus* (ZANELLA, 2003; CARVALHO, 2012). Aproximadamente 73 a 75 % dos grãos de pólen produzidos pelas espécies de *Echinodorus* são considerados viáveis (VIEIRA; LIMA, 1997; PANSARIN; PANSARIN, 2011). Durante o inverno, é comum a interrupção da floração e intensa senescência foliar, que nas espécies anuais leva à morte, entretanto há emissão de plântulas adventícias pelos rizomas (KAUL, 1985; REGO, 1988; VIEIRA; LIMA, 1997; JOAQUIM *et al.*, 2010).

Os indivíduos do gênero *Echinodorus* podem ser somente hermafroditas, caso da *E. grandiflorus*,

ou podem apresentar ginodioicia, como a espécie *E. longipetalus*, que apresenta flores unissexuadas e hermafroditas (PANSARIN, 2008; PANSARIN; PANSARIN, 2011), sendo que a população estudada por Pansarin (2008) era composta por 50% de indivíduos com flores femininas, que produziam 31% mais flores que os hermafroditas. Cada inflorescência dura aproximadamente 30 dias e contém em média 220 flores (BRUGIOLO *et al.*, 2007). O período de antese floral de indivíduos *E. grandiflorus* é de 8 horas e apresenta autoincompatibilidade, sendo necessários polinizadores para transferir o pólen entre os indivíduos e mecanismo de autoesterilidade tardia, cerca de 30 dias após a autopolinização, como consequência, *E. grandiflorus* apresenta produção de muitos frutos, porém poucas plantas adventícias são formadas (VIEIRA; LIMA, 1997; PANSARIN; PANSARIN, 2011). Com relação ao período de floração, pode-se apresentar variável entre acessos de mesma espécie oriundos de localidades diferentes, com plantas de florescimento precoce e maior vigor na brotação e, outras, que sequer floresceram (BEVILAQUA *et al.*, 2001).

Os estudos de atividade biológica e de caracterização química das espécies de chapéu-de-couro têm contribuído para entendimento de suas ações medicinais. Já foram comprovadas atividades diurética, anti-inflamatória e antinecrótica tumoral de extratos das folhas de *E. grandiflorus* (GARCIA *et al.*, 2016b; GARCIA *et al.*, 2016a; PRANDO *et al.*, 2016). Porém, o uso descontrolado e por longo prazo do extrato pode implicar em algum risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, devido sua atividade genotóxica comprovada (LIMA-DELLAMORA *et al.*, 2014). Trabalhando com o chá das folhas de *E. grandiflorus*, Lunardi *et al.* (2014) comprovaram que esse é capaz de prevenir danos oxidativos ao organismo. O estudo do extrato bruto de *E. macrophyllus* confirmou ação protetora a lesões renais (PORTELLA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Assim como o extrato de *E. grandiflorus*, o extrato das folhas de *E. macrophyllus* teve ação anti-inflamatória confirmada (SILVA *et al.*, 2016), com ausência de atividade genotóxica e mutagênica (VAZ *et al.*, 2016).

Foram isolados para a espécie *E. macrophyllus* diterpenos clerodânicos, cembrânicos e labdânicos, alcaloides, glicosídeos, óleos essenciais, saponinas, polifenóis, esteroides e ácidos orgânicos (KOBAYASHI *et al.*, 2000a). Os compostos majoritários do óleo essencial de *E. macrophyllus* são dilapiol, 2-tridecanona e óxido de cariofileno (COELHO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013), sendo que, os componentes do óleo essencial exercem grande parte das atividades biológicas da planta (SILVA *et al.*, 2013).

As folhas de *E. grandiflorus* apresentam em sua composição diterpenos (do tipo clerodano e cembrano), flavonoides (C-heterosídeos de flavonas do tipo *swertisin*, *isoorientin-7,3'-dimethylether*, *Isoorientin*, *swertiajaponin* e *isovitexin*), derivados do ácido o-hidroxicinâmico (ácidos chicórico e caftárico), esteroides, ácidos graxos, arilpropanoides simples (ácido cafeico, ferúlico e isoferúlico), ácido o-hidroxicinâmico e ácido *trans*-aconítico (LOPES *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2016b). O óleo essencial de *E. grandiflorus* tem como componente majoritário o fitol, além dos sesquiterpenos (*E*-cariofileno, α -humuleno e (*E*)-nerolidol (PIMENTA *et al.*, 2006).

Referências

ARAÚJO, M. B. *et al.* Biodiversidade e Alterações Climáticas na Península Ibérica/Biodiversidad y Alteraciones Climáticas en la Península Ibérica. **Biodiversidade e Alterações Climáticas**. Ministério da Ambiente e Ordenamento do Território e Ministério do Meio Ambiente e Meio Rural e Marino. Lisboa, Madrid. 658 p. 2012.

BARBOSA, U. A. *et al.* Determination and Evaluation of the Metals and Metalloids in the Chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli). **Biological Trace Element Research**, v. 154, n. 3, p. 412-417, 2013.

BOLSON, M. *et al.* Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira, 6ª Edição – Monografias: Plantas Medicinais**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 2, 739 p., 2019.

CARVALHO, A. T. **Interações entre *Protodiscelis* (*Colletidae*, *Neopasiphaeinae*) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores**. 133 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CARVALHO, A.T.; SCHLINDWEIN, C. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 2, p. 355-368, 2011.

COELHO, M. G. *et al.* Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, p. 245-251, 2013.

CROW, G. E. Species diversity in aquatic angiosperms: latitudinal patterns. **Aquatic Botany**, v. 44, n. 2-3, p. 229-258, 1993.

DA SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 445-450, 2010.

DUARTE, G. S. V. *et al.* Efeito das características ambientais sobre a riqueza e composição de macrófitas aquáticas em córregos urbanos. **Ciência e Natura**, v. 37, n.3, p. 74-94, 2015.

GARCIA, E. F. *et al.* Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

GARCIA, E. F. *et al.* Effect of the Hydroethanolic Extract from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and a Fraction Enriched in Flavone-C-Glycosides on Antigen-Induced Arthritis in Mice. **Planta Médica**, v. 82, n. 05, p. 407-413, 2016a.

GARCIA, E. F. *et al.* In vitro TNF- α inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. **Planta Médica**, v. 82, n. 04, p. 337-343, 2016b.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. Notes on *Echinodorus* (Alismataceae). **Brittonia**, v. 38, n. 4, p. 325-332, 1986.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Revista da Propriedade Industrial: Patentes Desenhos Industriais Contratos de Tecnologia Programas de Computador Indicações Geográficas Topografias de Circuitos Integrados**. Seção I, nº 2285, de 21 de outubro de 2014, 392 p. Disponível em: < <http://revistas.inpi.gov.br/pdf/PATENTES2285.pdf>>. Acesso em: jul. 2017.

IPCC. International Panel on Climate Change. Summary for policymakers. In: Climate Change 2014: Impacts, adaptation and vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. **Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1-32. 2014.

KOBAYASHI, J. I. *et al.* Chapecoderins A–C, New Labdane-Derived Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 3, p. 375-377, 2000a.

KOBAYASHI, J. I. *et al.* Echinophyllins C– F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 11, p. 1576-1579, 2000.

LEHTONEN, S. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. **Kew Bulletin**, v. 63, n. 4, p. 525-563, 2008.

LEHTONEN, S. Shutting down the chaos engine—or, identifying some problematic *Echinodorus* (Alismataceae) types. In: *Annales Botanici Fennici*. **Finnish Zoological and Botanical Publishing Board**, p. 115-129, 2016.

LEITE, K. R. B.; FRANÇA, F.; SCATENA, V. L. Structural variations among monocot emergent and amphibious species from lakes of the semi-arid region of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 163-169, 2012.

LIMA-DELLAMORA, E. C. *et al.* Genotoxic Maillard byproducts in current phytopharmaceutical preparations of *Echinodorus grandiflorus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1385-1394, 2014.

LUNARDI, R. F. *et al.* In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, “leather hat,” in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1451-1462, 2014.

- MATIAS, L. Q.; SOARES A.; SCATENA, V. L. Systematic consideration of petiole anatomy of species of *Echinodorus Richard* (Alismataceae) from north-eastern Brazil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 202, n. 5, p. 395-402, 2007.
- MATIAS, L. Q.; SOUSA, D. J. L. D. Alismataceae no estado do Ceará, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 4, p. 887-900, 2011.
- MORO, M. F.; DE SOUSA, D. J. L.; MATIAS, L. Q. Rarefaction, richness estimation and extrapolation methods in the evaluation of unseen plant diversity in aquatic ecosystems. **Aquatic Botany**, v. 117, p. 48-55, 2014.
- NASCIMENTO, E. L. D. *et al.* Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, n. 1, p. 12-17, 2014.
- OLIVEIRA, A.; BOVE, C. Checklist of aquatic and marshy Monocotyledons from the Araguaia River basin, Brazilian Cerrado. **Biodiversity Data Journal**, n. 4, 2016.
- PANSARIN, E. R. Reproductive biology of *Echinodorus longipetalus* (Alismataceae): sexual morphs, breeding system and pollinators. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 4, p. 404-408, 2008.
- PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. C. E. Alismataceae. In: WANDERLEY, M. G. L. *et al.* **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. Rima, São Paulo, p. 1-10, 2005.
- PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. Reproductive biology of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae): evidence of self-sterility in populations of the state of São Paulo. **Rodriguésia**, v. 62, n. 1, p. 213-221, 2011.
- PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 623-628, 2006.
- PORTELLA, V. G. *et al.* Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Nephron Extra**, v. 2, n. 1, p. 177-183, 2012.
- PRANDO, T. B. L. *et al.* Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249-1258, 2016.
- RATAJ, K. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. Et Schlecht.) Mich., its geographical distribution and variability. **Folia Geobotanica & Phytotaxonomica**, v. 4, n. 3, p. 319-326, 1969.
- RIBEIRO, E. S. *et al.* Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb**, v. 19, p. 605-612, 2015.
- SILVA, G. P. *et al.* Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits

high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1584-1596, 2016.

SILVA, T. M. *et al.* Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 22-26, 2012.

STRADA, C. L. *et al.* 2017. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 619-626, 2017.

TABOSA, A. B.; MATIAS, L. Q.; MARTINS, F. R. Live fast and die young: the aquatic macrophyte dynamics in a temporary pool in the Brazilian semiarid region. **Aquatic Botany**, v. 102, p. 71-78, 2012.

VAZ, M. S. M. *et al.* Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of ethanol extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves in vivo. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 32-38, 2016.

VIEIRA, M. F.; LIMA, N. A. S. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). **Aquatic Botany**, v. 58, n. 2, p. 89-98, 1997.

WAN-RU, L. Effect of organic acids amendment on cadmium uptake and translocation by *Echinodorus Osiris*. **Turang Tongbao**, v. 45, n. 1, p. 205-209, 2014.

YING, L.; LEI, L. A. Comparison of decontaminating effects of hydroponic plants on domestic sewage. **Jiangxi Nongye Daxue Xuebao**, v. 36, n. 4, p. 881-886, 2014.

ZANELLA, F. C. V. Abelhas da Estação Ecológica do Seridó (Serra Negra do Norte, RN): aportes ao conhecimento da diversidade, abundância e distribuição espacial das espécies na caatinga. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: Editora UNESC, 2003. p. 231-240, 2003.

4. ARTIGOS

4.1. Artigo 1 - Diversidade em *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. e *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb.: descritores e fenologia

Este artigo foi elaborado conforme normas da Revista Ciência Rural

Resumo

O nome chapéu-de-couro é designado popularmente às espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* (Alismataceae). Nativas do Brasil, suas folhas são utilizadas na medicina tradicional como diurética e anti-inflamatória, sem nenhuma distinção entre espécies, devido às semelhanças que essas apresentam, porém, apenas duas espécies têm o uso reconhecido pela Farmacopeia Brasileira. Para suprir as demandas do mercado interno, o chapéu-de-couro é alvo de extrativismo, prática esta que ameaça as populações naturais dessas espécies. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da diversidade de duas espécies de chapéu-de-couro (*Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*) a fim de obter informações que contribuam na identificação e subsídios para a domesticação das espécies. Para isso, foram coletados acessos das duas espécies para a formação de um banco de germoplasmas em casa de vegetação. Foram realizadas análises de caracterização morfológica, caracterização química de compostos voláteis e fenologia. Os descritores limbo foliar, ápice e base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar mostraram-se eficientes na diferenciação entre as duas espécies. Quimicamente, *E. floribundus* e *E. subalatus* foram similares a *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* devido à presença dos compostos (*Z*)-beta-cariofileno e (*E*)-beta-cariofileno. Foi observada diversidade entre acessos para *E. floribundus* e *E. subalatus*. Apesar da produção de folhas maduras contínuas, ambas as espécies apresentaram período de senescência foliar acentuado, comum entre as espécies do gênero. O ciclo de floração das espécies estudadas é similar ao das espécies de *Echinodorus* descritas na literatura.

Palavras-chave: Extrativismo. Plasticidade fenotípica. Sistema aquático.

Abstract

The name “chapéu-de-couro” is popularly assigned to species belonging to the genus *Echinodorus* (Alismataceae). Native to Brazil, its leaves are used in traditional medicine as diuretic and anti-inflammatory, without any distinction between species, due to their similarities, but only two species have the use recognized by the Brazilian Pharmacopoeia. To meet the demands of the domestic market, the “chapéu-de-couro” is the target of extractivism, a practice that threatens the natural populations of these species. The aim of the work was to study the diversity of two “chapéu-de-couro” species (*Echinodorus floribundus* and *Echinodorus subalatus*) in order to obtain information that contributes to the identification and subsidies for the domestication of the species. For this, accessions of the two species were collected for the formation of a germplasm bank in a greenhouse. Morphological characterization, chemical characterization of volatile compounds and phenology analyzes were performed. The descriptors leaf limb, leaf limb apex and base, leaf hairiness and leaf petiole hairiness were efficient in differentiating between the two species. Chemically, *E. floribundus* and *E. subalatus* were similar to *E. grandiflorus* and *E. macrophyllus* due to the presence of (*Z*)-beta-caryophyllene and (*E*)-beta-caryophyllene compounds. Diversity between accessions for *E. floribundus* and *E. subalatus* was observed. Despite the continuous production of mature leaves, both species presented a period of accented leaf senescence, usual in the species of the genus. The flowering cycle of the studied species is similar to that of the *Echinodorus* species described in the literature.

Keywords: Extractivism. Phenotypic plasticity. Aquatic system.

INTRODUÇÃO

O termo chapéu-de-couro designa um grupo de plantas herbáceas da família Alismataceae, pertencentes ao gênero *Echinodorus* (HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1986). Essas espécies podem se apresentar como macrófitas emergentes (ROCHA et al., 2007; TRINDADE et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012; CANALLI & BOVE, 2017), por estarem enraizadas no fundo de corpos d'água, com partes vegetativas e reprodutivas emersas (PEDRALLI, 1990) ou macrófita anfíbia (VIANA, 2005; TRINDADE et al., 2010), quando encontradas às margens de corpos d'água, tolerante a períodos de seca (PEDRALLI, 1990). Suas folhas são empregadas popularmente com fins diurético, hipotensivo e anti-inflamatório (BOLSON et al., 2015). Além do valor medicinal, são ornamentais e matéria-prima para a produção de um refrigerante de ampla comercialização nacional (LIMA-DELLAMORA et al., 2014; MONTEIRO, 2016), tendo assim, grande importância cultural e econômica.

O gênero *Echinodorus* é composto por 27 espécies (LEHTONEN, 2008), dessas, 22 espécies estão distribuídas entre os diferentes estados brasileiros, sendo 12 espécies de ocorrência natural no estado de Minas Gerais, dentre as quais se destacam *Echinodorus grandiflorus*, *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub., *Echinodorus macrophyllus* e *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. (MATIAS, 2019). Essas têm sido utilizadas para fins medicinais pela população, porém apenas as espécies *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* possuem ações biológicas medicinais comprovadas (PORTELLA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014; GARCIA et al., 2016; SILVA et al., 2016; PRANDO et al., 2016; VAZ et al., 2016). Isso ocorre devido à dificuldade de identificação das espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus*, pois tais apresentam grande variabilidade intraespecífica e homogeneidade interespecífica (REGO, 1988 apud POTT et al., 2018, p. 118).

O extrativismo das folhas do chapéu-de-couro supre as demandas do mercado, porém não são tomadas práticas de manejo sustentável e não há estudos que relatem o impacto do extrativismo sobre essas espécies. A prática de extrativismo, realizada de modo desenfreado pode causar drástica redução ou desaparecimento local das populações, o que contribui para o risco de extinção das espécies (BORGES FILHO & FELFILI, 2003; LOURENZANI, LOURENZANI & BATALHA, 2004). Outro fator agravante a esse cenário é dado pela eutrofização dos ambientes alagados, em decorrência de ações antrópicas, que têm alterado características físicas, químicas e biológicas, tornando-os muitas vezes inaptos para a biota (ARAÚJO et al., 2009). Alterações no sistema aquático, mesmo que em menor escala, como alteração no nível da água, podem ocasionar mudanças nas comunidades vegetais (COOPS et al., 2003). Em Minas Gerais, nas regiões Norte e Vale do Jequitinhonha, as consequências das ações antrópicas têm acelerado o secamento e assoreamento hídrico, degradação de áreas de veredas (AUGUSTIN, DE MELO & ARANHA, 2019), habitats das populações naturais de *Echinodorus*.

O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da diversidade de duas espécies de chapéu-de-couro (*Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*), a fim de obter informações que contribuam na identificação e possam subsidiar a domesticação das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de germoplasma

Para a realização da coleta do material vegetal em campo foi concedida, pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), a Autorização para pesquisa científica no estado de Minas Gerais, nº 041/2018, número do cadastro no SisGen: A97D542. Os acessos foram formados pela amostragem mínima de dois indivíduos adultos de cada população, coletados aleatoriamente, de maneira que cada um dos municípios possuiu um acesso, com exceção do município de Montes Claros, com três acessos (Tabela 1). Materiais floridos foram herborizados e depositadas no Herbário MCCA (Voucher: MCCA 2595 e MCCA 3123).

A conservação do germoplasma, *ex situ* e *in vivo*, e os demais experimentos, foram conduzidos no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), em Montes Claros (coordenadas: 16° 40' 58,5"S, 43° 50' 25,6", altitude 626 metros). O clima da região é caracterizado como tropical típico, quente e semiúmido, com estação chuvosa curta (verão) e seca prolongada (inverno) bem definidas, Aw, segundo a classificação de Köppen. As temperaturas médias anuais de estão entre 22 e 24°C e a pluviosidade média entre 1000 e 1200 mm (LOPES et al., 2011) (Figura 1).

O banco de germoplasma foi formado com o plantio dos indivíduos de cada acesso em vasos de 5 litros, sendo utilizada como substrato a mistura solo:areia:esterco curtido na proporção 3:2:1. O solo utilizado possuía as seguintes características: textura argilosa, pH 7,3; P 360 mg dm⁻³; K 30 mg dm⁻³; Ca 4,30 cmolc dm⁻³; Mg 1,20 cmolc dm⁻³; H+Al 0,85 cmolc dm⁻³; SB 5,58 cmolc dm⁻³; t 5,58 cmolc dm⁻³; T 6,43 cmolc dm⁻³; V 87%, argila 12 dag kg⁻¹; matéria orgânica 2,57 dag kg⁻¹; carbono orgânico 1,49 dag kg⁻¹. A irrigação foi feita manualmente, com saturação do solo e regularidade de dois dias.

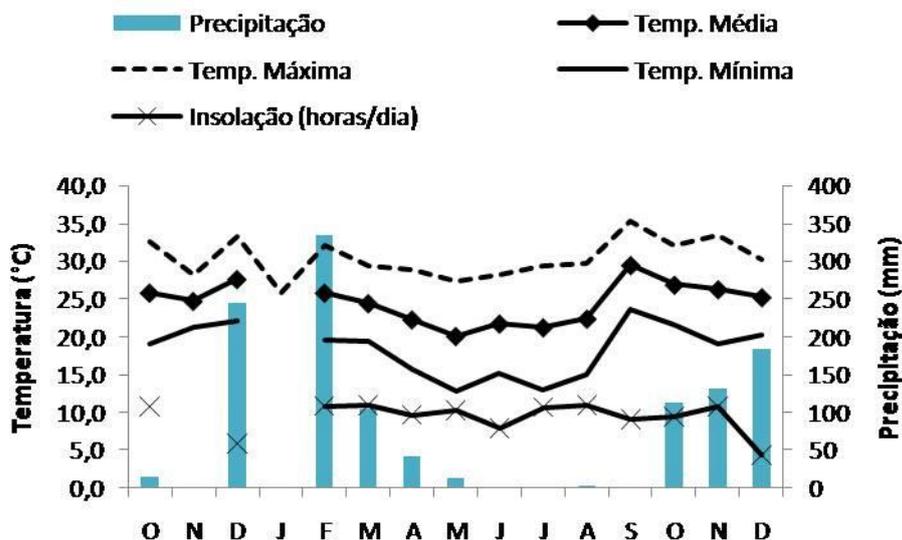


Figura 1 Série histórica do município de Montes Claros - MG durante o período de setembro de 2017 a dezembro de 2018

Fonte: Dados INMET (2019).

Tabela 1- Caracterização dos acessos de ocorrência de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* em Minas Gerais, Brasil

Acesso	Município	Coordenadas		Altitude (m)	Pr (mm)	Temp. (°C)	CC (Köppen)	Ambiente	Vegetação
		Latitude	Longitude						
<i>Echinodorus floribundus</i>									
BTM	Botumirim	16°51'08"S	43°00'20"W	865	1002	20.6	Cwa	Brejo	Cerrado
CNM	Cônego Marinho	15°17'09"S	44°25'41"W	468	1022	23.5	Aw	Vereda	Transição Caatinga/Cerrado
CPL	Capelinha	17°41'29"S	42°30'58"W	932	1084	20.5	Cwa	Solo arenoso	Mata Atlântica
CTL	Cristália	16°45'17"S	42°54'30"W	770	954	21.6	Aw	Brejo	Cerrado
ITC	Itacambira	17°03'50"S	43°18'42"W	1052	1092	19.9	Cwa	Brejo	Mata ciliar/Cerrado
RPM	Rio Pardo de Minas	15°36'03"S	42°32'40"W	850	910	21.2	Aw	Brejo	Cerrado
SRR	Serro	18°36'21"S	43°23'13"W	1359	1471	20.5	Cwa	Lago próximo ao Rio Jequitinhonha	Transição Cerrado/Mata Atlântica
STB	Setubinha	17°35'16"S	42°10'08"W	731	1034	21.6	Aw	Brejo	Mata Atlântica
STR	Santana do Riacho	19°07'01"S	43°40'49"W	1109	1457	21.1	Cwa	Próximo ao rio	Cerrado
<i>Echinodorus subalatus</i>									
MC1	Montes Claros	16°44'13"S	43°51'53"W	533	1005	23.5	Aw	Córrego não perene	Caatinga
MC2	Montes Claros	16°44'13"S	43°51'53"W	662	1029	22.7	Aw	Próximo ao rio Riachão	Cerrado
MC3	Montes	16°44'13"S	43°51'53"W	646	1029	22.7	Aw	Beira da lagoa	Transição Caatinga/Cerrado

	Claros							/parque municipal	
MC4	Montes Claros	16°44'13"S	43°51'53"W	?	1029	22.7	Aw	Brejo	Cerrado
RCH	Riachinho	16°14'12"S	46°00'30"W	550	1165	23.6	Aw	Beira de cachoeira	Cerrado
SJP	São João da Ponte	15°55'30"S	44°00'48"W	626	936	22.7	Aw	"Barroca", córrego não perene	Transição Caatinga/Cerrado

Pr: precipitação; CC: Classificação climática; Aw: Clima tropical, com inverno seco; Cwa: Clima subtropical de inverno seco; ?: informação não encontrada.

Caracterização morfológica vegetativa

Seis meses após o transplântio, procedeu-se à avaliação dos componentes vegetativos para a caracterização dos acessos. Foram utilizados descritores qualitativos (hábito de crescimento vegetal, formato do limbo foliar, ápice do limbo foliar, base do limbo foliar, tipo de nervura, pilosidade foliar adaxial, pilosidade foliar abaxial e pilosidade do pecíolo) e quantitativos (altura do indivíduo sem inflorescência, número de folhas adultas, comprimento do limbo foliar, largura do limbo foliar, comprimento do pecíolo foliar e número de nervuras) para o processo de caracterização morfológica. A escolha dos descritores foi baseada na lista de descritores recomendados para *Piper nigrum* (IPGRI, 1995). A classificação dos descritores foi realizada com o auxílio de bibliografia especializada (FONT-QUER, 1963; RADFORD, 1974; GONÇALVES & LORENZI, 2007).

Foram feitas análises estatísticas com o auxílio do software R (TEAM, 2017), pelo qual se realizou o estudo da dissimilaridade entre os acessos de *E. floribundus* e *E. subalatus* por meio dos descritores morfológicos. Foi calculada a distância de Gower e os dendrogramas foram construídos utilizando o método de agrupamento por otimização (Tocher). Para obter informações sobre a eficiência do dendrograma, foi calculada a correlação cofenética. Para estabelecer o ponto de corte no dendrograma recorreu-se ao método de Mojena.

Caraterização do perfil de compostos voláteis

Folhas jovens dos acessos de *E. floribundus* e *E. subalatus* foram coletadas (1 g) dos espécimes da coleção de germoplasma e imediatamente transferidas para frascos de vidro hermético (20 mL) tipo *headspace*, com tampa de alumínio e septo de silicone. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC7890A), acoplado a espectrômetro de massas (MS5975C) e coluna capilar DB-5 MS (Agilent Technologies) com fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolisiloxano (30 m comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 μm espessura do filme interno). Hélio (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste à taxa de 1 mL min⁻¹. A temperatura de incubação das amostras foi de 100°C, durante 300 segundos, com temperatura da seringa 100°C, velocidade do agitador de 500 rpm, velocidade de preenchimento e velocidade de injeção 500 μLs^{-1} . O injetor foi mantido a 100°C. A programação de temperatura foi 60°C, 3°C min⁻¹ até 240°C, por 10 minutos e temperatura final de 300°C. O volume injetado de amostra foi de 1 mLmin⁻¹ no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*). Foi realizada também a análise do branco (*vial* sem amostra) e de uma amostra saturada de hidrocarbonetos (Sigma-Aldrich, C10 - C40).

A identificação dos voláteis de cada acesso de *E. floribundus* e *E. subalatus* foi realizada pela comparação de espectros de massas com a biblioteca virtual *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2005) e por comparação do índice de retenção calculado (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963) e a literatura (ADAMS, 2012).

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software R (Team, 2017). A dissimilaridade química quanto ao perfil cromatográfico dos voláteis identificados na análise de HS-CG/EM dos acessos de *E. floribundus* e *E. subalatus* foi calculada a partir do índice de Jaccard, para dados binários. O dendrograma foi construído utilizando o método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Para obter

informações sobre a eficiência do dendrograma, foi calculada a correlação cofenética. Para estabelecer o ponto de corte no dendrograma recorreu-se ao método de Mojena.

Fenologia

Para o estudo fenológico, os indivíduos foram observados semanalmente durante a fase vegetativa e com intervalo de três dias durante a fase reprodutiva, entre setembro de 2017 e dezembro de 2018. As fenofases avaliadas foram: (1) brotamento: pequenas folhas em desenvolvimento, com coloração verde-clara; (2) folhas jovens: folhas com cerca de $\frac{3}{4}$ do comprimento das folhas adultas e coloração verde-clara; (3) folhas adultas: completamente desenvolvidas com coloração verde-escura; (4) queda foliar: presença de folhas amarelas; (5) botões florais: início da formação da inflorescência até a pré-antese das flores; (6) floração: abertura das flores até sua abertura completa; (7) flores secas: senescência da flor até a sua queda, exceto ovário; (8) frutos imaturos: frutos com coloração esverdeada; (9) frutos maduros: frutos com coloração amarronzada e em dispersão (Figuras 1 e 2). Os monitoramentos foram realizados no período da manhã, devido ao horário de antese das flores desse gênero (VIEIRA & LIMA, 1997). Os eventos fenológicos foram quantificados por meio do cálculo do índice de intensidade, que representa o somatório dos eventos na população, e o índice de atividade, que representa a porcentagem de indivíduos da população que manifestaram o evento (BENCKE & MORELLATO, 2002). Foi considerado evento fenológico não sincrônico ou assincrônico: < 20% de indivíduos na fenofase; pouco sincrônico ou sincronia baixa: 20-60% de indivíduos na fenofase e sincronia alta: > 60% de indivíduos na fenofase (BENCKE & MORELLATO, 2002).

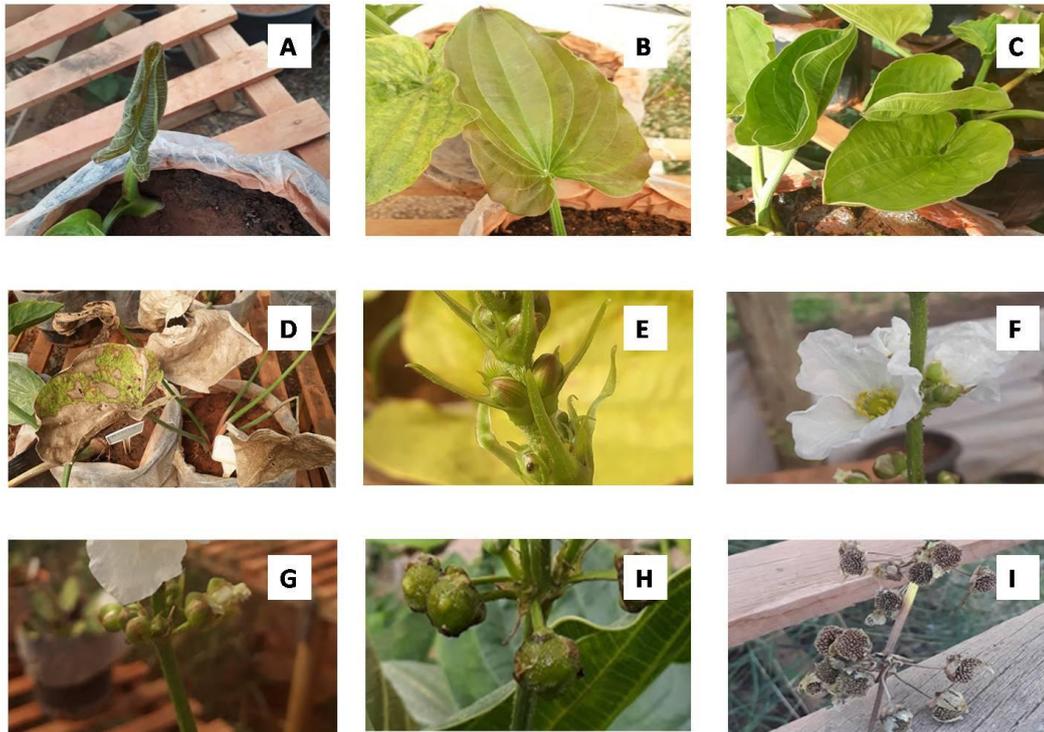


Figura 2 Representação visual das fenofases vegetativas (A-D) e reprodutivas (E-I) de *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. em cultivo. A: brotamento; B: folhas jovens; C: folhas adultas; D: queda foliar; E: botões florais; F: floração; G: flores secas; H: frutos imaturos e I: frutos maduros.

Fonte: do autor.

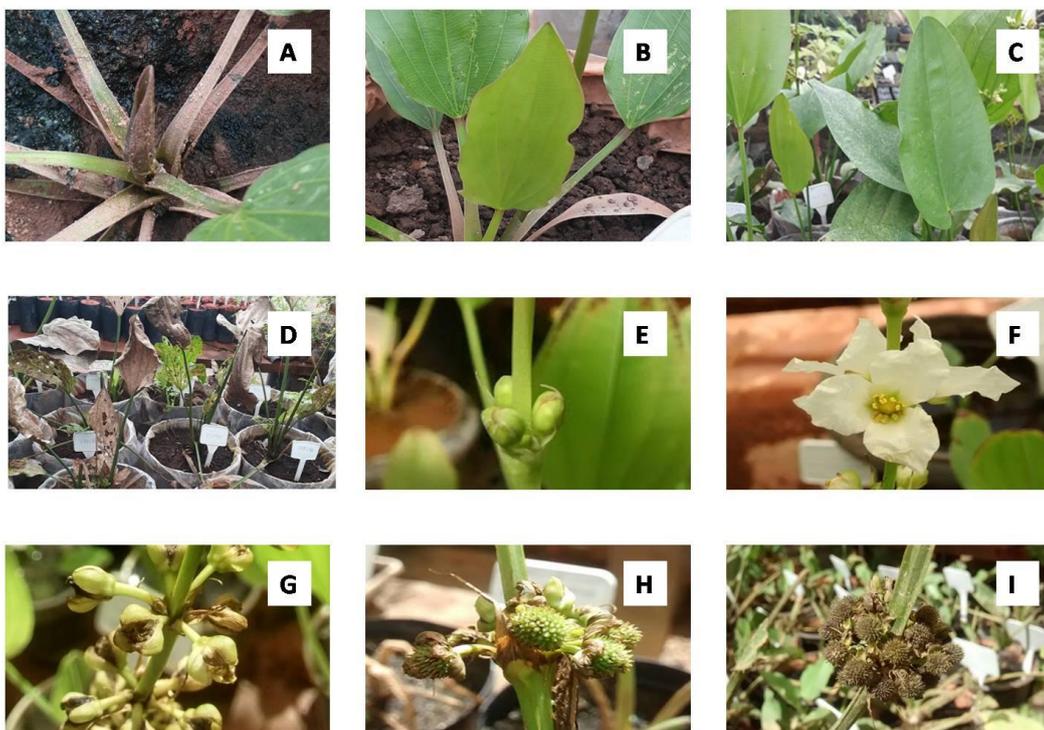


Figura 3 Representação visual das fenofases vegetativas (A-D) e reprodutivas (E-I) de *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. em cultivo. A: brotamento; B: folhas jovens; C: folhas adultas; D: queda foliar; E: botões florais; F: floração; G: flores secas; H: frutos imaturos e I: frutos maduros.

Fonte: do autor.

RESULTADOS

Caracterização morfológica vegetativa

Com relação aos descritores morfológicos qualitativos, observa-se que o hábito de crescimento de *E. floribundus* em maior parte é do tipo ereto, porém há também o tipo prostrado (Tabela 2). A espécie *E. floribundus* apresenta limbo foliar do tipo cordiforme, com ápice foliar mucronado, base do limbo foliar do tipo cordado, nervuras principais curvinérveas, pilosidade por toda extensão do pecíolo foliar, ausência pilosidade foliar na face adaxial das folhas, porém na face abaxial pode ocorrer ausência de pilosidade, pilosidade presente por toda a face adaxial da folha, ou pilosidade principalmente ao longo das nervuras. Já o pecíolo foliar apresentou pilosidade por toda a sua extensão, sendo uma característica observada em todos os acessos (Tabela 2).

Assim como *E. floribundus*, a espécie *E. subalatus* apresentou hábito de crescimento que variou entre ereto e prostrado. Outras variações com relação aos descritores qualitativos foram observadas dentro da espécie, como ápice foliar, que variou entre as formas obtusa, mucronada e aguda, e base foliar do tipo truncada, obtusa e acunhada. Porém nota-se que não houve variação quanto ao formato do limbo foliar, que é do tipo ovado. Tanto na face adaxial quanto na face abaxial das folhas não foi observada a presença de pilosidade. O mesmo se deu para a extensão do pecíolo (Tabela 3).

Dos descritores qualitativos estudados, apenas o tipo de nervura é comum para ambas as espécies, nervuras curvinérveas, não sendo indicado para auxiliar na diferenciação entre as duas espécies. Os descritores formato e base do limbo foliar e pilosidade do pecíolo foliar são os mais indicados para serem usados na distinção entre as duas espécies.

Tabela 2 Variações para os descritores morfológicos qualitativos dos acessos de *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. no banco de germoplasma, em Montes Claros, Minas Gerais

Acesso	Hábito de crescimento	Pilosidade foliar da face abaxial
BTM	Prostrado/Ereto	Ausente/Por toda a folha/ Principalmente ao longo das nervuras
CNM	Ereto	Por toda a folha/Principalmente ao longo das nervuras
CPL	Ereto	Ausente
CTL	Prostrado/Ereto	Ausente/Por toda a folha
ITC	Prostrado/Ereto	Ausente/Por toda a folha/ Principalmente ao longo das nervuras
SRR	Ereto	Principalmente ao longo das nervuras
RPM	Prostrado/Ereto	Ausente
STR	Prostrado/Ereto	Por toda a folha
STB	Ereto	Por toda a folha

BTM: Botumirim, CNM: Cônego Marinho, CPL: Capelinha, CTL: Cristália, ITC: Itacambira, SRR: Serro, RPM: Rio Pardo de Minas, STR: Serra do Cipó e STB: Setubinha.

Tabela 3 Variações observadas nos descritores morfológicos qualitativos dos acessos de *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. no banco de germoplasma, em Montes Claros, Minas Gerais

Acesso	Hábito de crescimento vegetal	Ápice do limbo foliar	Base do limbo foliar
MC1	Prostrado/Ereto	Agudo	Truncada
MC2	Prostrado/Ereto	Obtusa	Truncada/Obtusa
MC3	Prostrado/Ereto	Mucronado	Truncada
MC4	Prostrado/Ereto	Obtusa/Mucronado/Agudo	Truncada/Obtusa/Acunheada
RCH	Prostrado/Ereto	Mucronado	Truncada
SJP	Prostrado	Agudo	Truncada

MC1: Montes Claros, MC2: Montes Claros, MC3: Montes Claros, MC4: Montes Claros, RCH: Riachinho e SJP: São João da Ponte.

No que se refere aos descritores quantitativos, foram observadas variações quanto à altura das plantas, comprimento e largura do limbo foliar e comprimento do pecíolo para *E. floribundus*. A altura de plantas variou de 13,60 a 58,73 cm entre os acessos. As dimensões do limbo foliar variaram de 2,27 a 20,50 cm de comprimento e 1,63 a 14,70 cm de largura. A variação no comprimento do pecíolo das plantas de *E. floribundus* foi de 5,87 a 27,90 cm (Tabela 4). Já para a *E. subalatus*, se observaram plantas com 17,10 cm até 40,93 cm de altura. Houve variação no número de folhas adultas por acesso, alguns acessos apresentaram apenas três folhas em média, mas houve acesso que apresentou em média 10 folhas adultas. As dimensões do limbo foliar variaram de 2,59 a 11,88 cm de comprimento e de 4,05 a 7,73 cm de largura. O comprimento mínimo do pecíolo de em *E. subalatus* foi de 3,74 cm e o máximo de 17,45 cm (Tabela 5). O número médio de nervuras principais foi distinto entre as duas espécies estudadas, sendo entre 7 e 17 nervuras por folha para *E. floribundus* e entre 6 e 9 nervuras por folha para *E. subalatus* (Tabelas 4 e 5), podendo ser utilizado também para identificação das duas espécies.

Tabela 4 Valores médios dos descritores morfológicos quantitativos dos acessos de *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. na coleção de germoplasma, em Montes Claros, Minas Gerais

Acesso	Altura (cm)	Número de folhas adultas (unidade)	Comprimento do limbo foliar (cm)	Largura do limbo foliar (cm)	Comprimento do pecíolo foliar (cm)	Número de nervuras (unidade)
BTM	38,30±15,07	3±0,69	17,52±6,46	14,70±6,08	19,00±13,03	9 - 17
CNM	33,50±20,19	3±0,84	17,94±4,97	12,55±3,25	10,90±4,06	14 - 17
CPL	58,73±8,27	2±0,00	20,50±1,43	14,52±0,95	27,90±12,78	16
CTL	29,35±8,84	2±0,00	10,75±1,06	06,43±0,11	5,87±5,48	10 - 15
ITC	45,49±24,07	2±0,98	17,16±2,66	12,42±2,41	18,20±10,43	11 - 17
SRR*	21,30	1	06,72	04,58	9,75	15
RPM	13,83±10,76	2±1,07	2,27±3,88	01,63±2,78	9,68±8,23	7 - 10
STR	26,87±7,20	3±0,82	15,50±6,07	11,89±3,75	16,83±8,23	10 - 15
STB*	13,60	1	09,00	06,50	11,00	12

*Acessos com apenas um indivíduo. BTM: Botumirim, CNM: Cônego Marinho, CPL: Capelinha, CTL: Cristália, ITC: Itacambira, SRR: Serro, RPM: Rio Pardo de Minas, STR: Serra do Cipó e STB: Setubinha.

Tabela 5 Valores médios dos descritores morfológicos quantitativos dos acessos de *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. na coleção de germoplasma, em Montes Claros, Minas Gerais

Acesso	Altura (cm)	Número de folhas adultas (unidade)	Comprimento do limbo foliar (cm)	Largura do limbo foliar (cm)	Comprimento do pecíolo foliar (cm)	Número de nervuras (unidade)
MC1	26,45±8,96	5±2,27	05,45±4,42	5,88±2,99	05,47±4,27	7 - 9
MC2	17,98±5,21	6±1,80	07,45±1,16	4,67±0,77	03,74±2,11	7
MC3	23,00±3,54	4±2,12	10,58±0,82	7,73±0,33	05,22±0,39	7
MC4	34,31±7,00	6±4,08	11,88±2,83	6,50±1,69	06,60±3,61	7 - 9
RCH	40,93±4,76	3±1,00	11,66±4,59	7,42±3,39	17,45±10,85	7 - 9
SJP	17,10±10,33	10±2,41	08,03±0,93	4,05±0,70	08,20±0,63	6 - 9

MC1: Montes Claros, MC2: Montes Claros, MC3: Montes Claros, MC4: Montes Claros, RCH: Riachinho e SJP: São João da Ponte.

Pelo estudo de dissimilaridade utilizando os descritores morfológicos, para a espécie *E. floribundus* foram formados cinco grupos. O primeiro composto pelos acessos CNM e RPM, o segundo por STM e CTL, o terceiro agrupou os acessos SRR e STR, o quarto por CPL e o quinto por ITC e BTM (Figura 4). Já para a espécie *E. subalatus*, os acessos MC-2, SJP e MC-4 foram dissimilares entre si e dos demais acessos, cada um permanecendo em um único agrupamento. Os acessos SJP, MC-2, MC-3 e MC-1 constituíram o primeiro grupo e RCH e MC-4 o grupo dois, totalizando dois grupos para a espécie *E. subalatus* (Figura 5). Esses resultados confirmam a diversidade morfológica intraespecífica das espécies *E. floribundus* e *E. subalatus*.

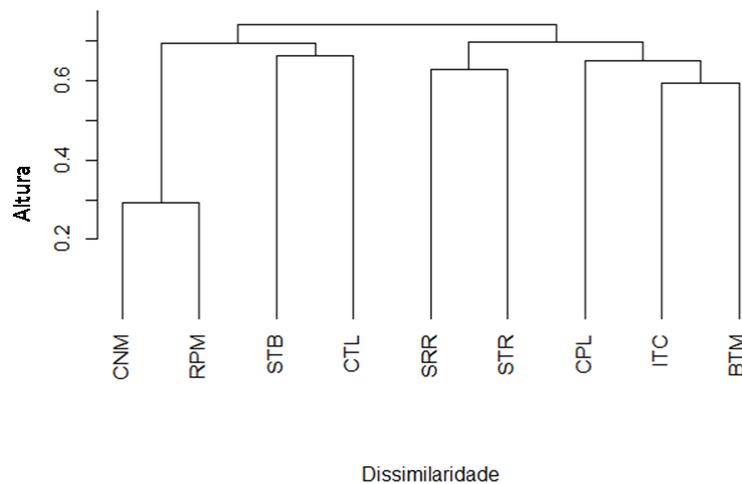


Figura 4 Dendrograma de dissimilaridade dos acessos de *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. por meio dos descritores morfológicos, utilizando o método de Tocher. BTM: Botumirim, CNM: Cônego Marinho, CPL: Capelinha, CTL: Cristália, ITC: Itacambira, SRR: Serro, RPM: Rio Pardo de Minas, STR: Serra do Cipó e STB: Setubinha

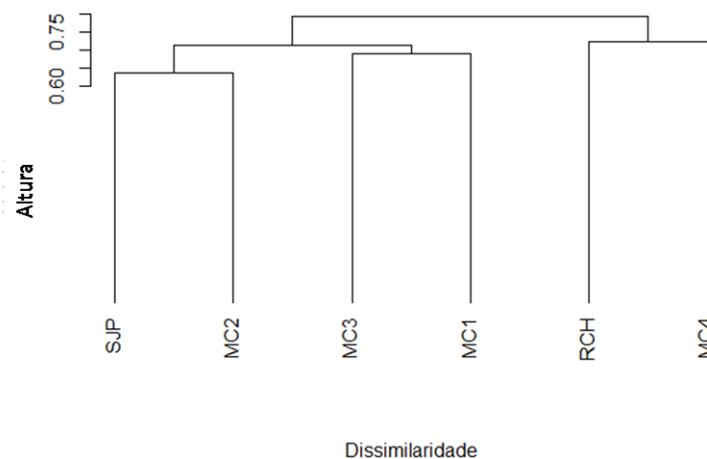


Figura 5 Dendrograma de dissimilaridade dos acessos de *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. por meio dos descritores morfológicos, utilizando o método de Tocher. MC1: Montes Claros, MC2: Montes Claros, MC3: Montes Claros, MC4: Montes Claros, RCH: Riachinho e SJP: São João da Ponte

Caraterização do perfil de compostos voláteis

Na análise dos voláteis presentes nas folhas de *E. floribundus* e *E. subalatus* foram detectados o (*Z*)-beta-cariofileno e (*E*)-beta-cariofileno em todos os acessos estudados, com exceção dos acessos MC1 (*E. subalatus*), STR e STB (*E. floribundus*) para o (*Z*)-beta-cariofileno e CTL e STB (*E. floribundus*) para o (*E*)-beta-cariofileno. No estudo de dissimilaridade foram formados cinco agrupamentos para a espécie *E. floribundus*, o que evidencia a grande diversidade química da espécie. Os clusters apresentaram a seguinte constituição: 1- BTM, CNM, CPL, SRR e RPM; 2- CTL; 3- ITC; 4- STR e 5- STB (Figuras 6 e 7). Para a espécie *E. subalatus*, formaram-se dois clusters, o primeiro composto pelos acessos MC1 e SJP, e o segundo pelos acessos MC2, MC3, MC4 e RCH (Figuras 8 e 9). Apesar de ser de origem diferente, o perfil de voláteis do acesso RCH apresentou similaridade química aos perfis dos acessos MC2, MC3 e MC4, que são oriundos de populações da mesma cidade, com distâncias de 47,6 km entre MC2 e MC3, 43,7 km entre MC2 e MC4 e 10,9 km entre MC3 e MC4.

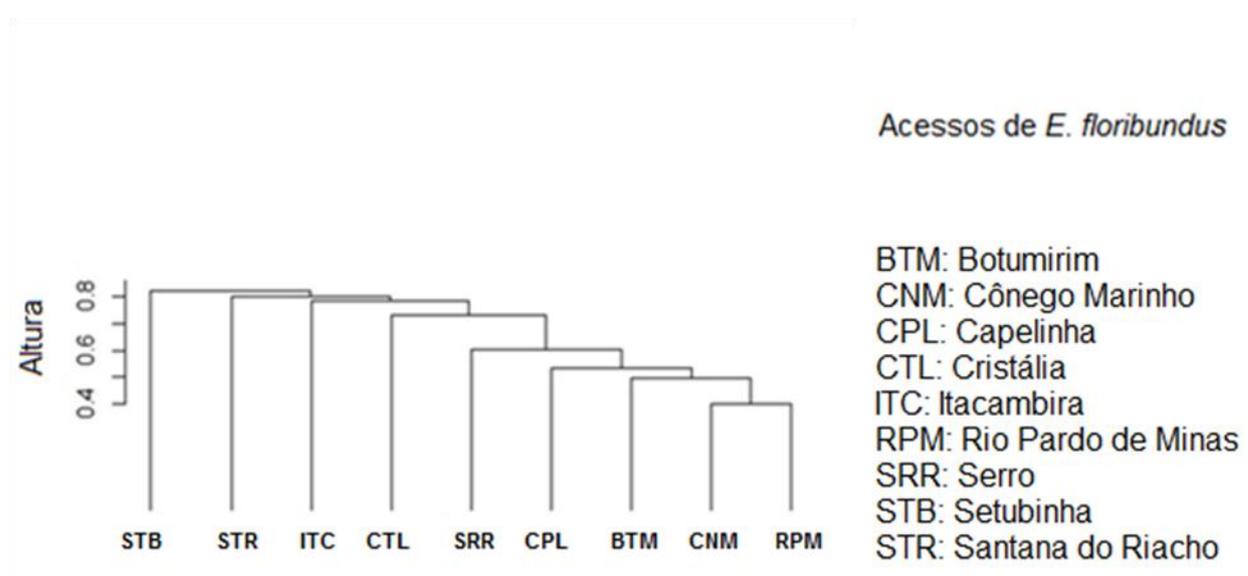


Figura 6 Dendrograma de dissimilaridade do perfil químico de compostos voláteis por *Headspace* (HS-CG/EM) de folhas dos acessos de *E. floribundus*, utilizando o método UPGMA

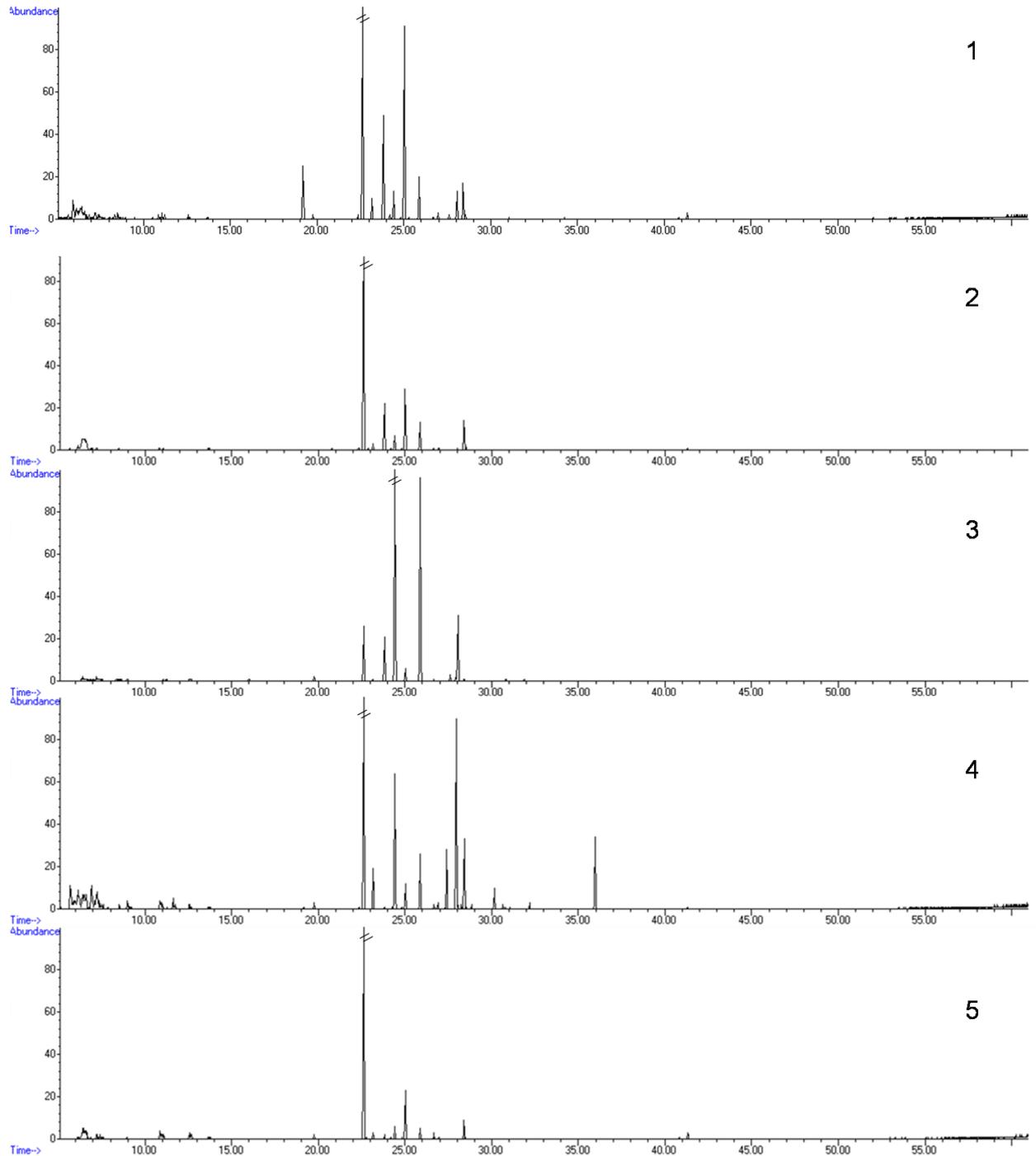


Figura 7 Cromatogramas dos perfis de compostos voláteis obtidos por *Headspace* (HS-CG/EM) que exemplificam as diferenças entre os agrupamentos de *Echinodorus floribundus*. 1- CNM (Cônego Marinho); 2- CTL (Cristália); 3- ITC (Itacambira); 4- STR (Santana do Riacho) e 5- STB (Setubinha)

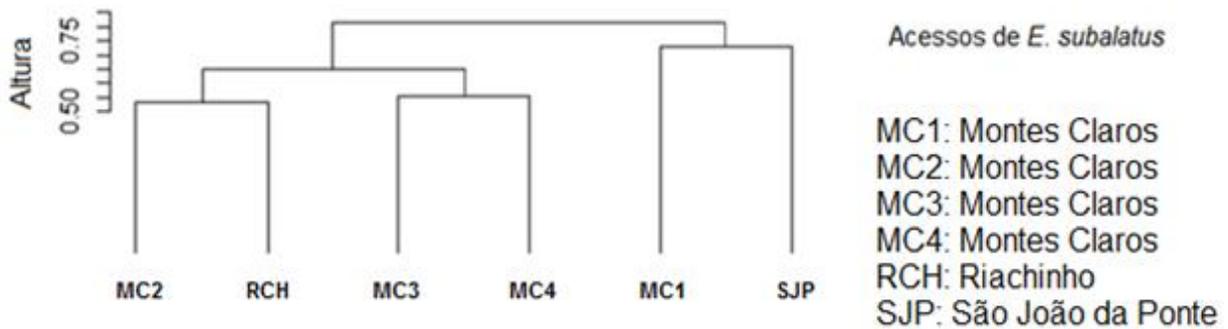


Figura 8 Dendrograma de dissimilaridade do perfil químico de compostos voláteis por *Headspace* (HS-CG/EM) de folhas dos acessos de *Echinodorus subalatus*, utilizando o método UPGMA

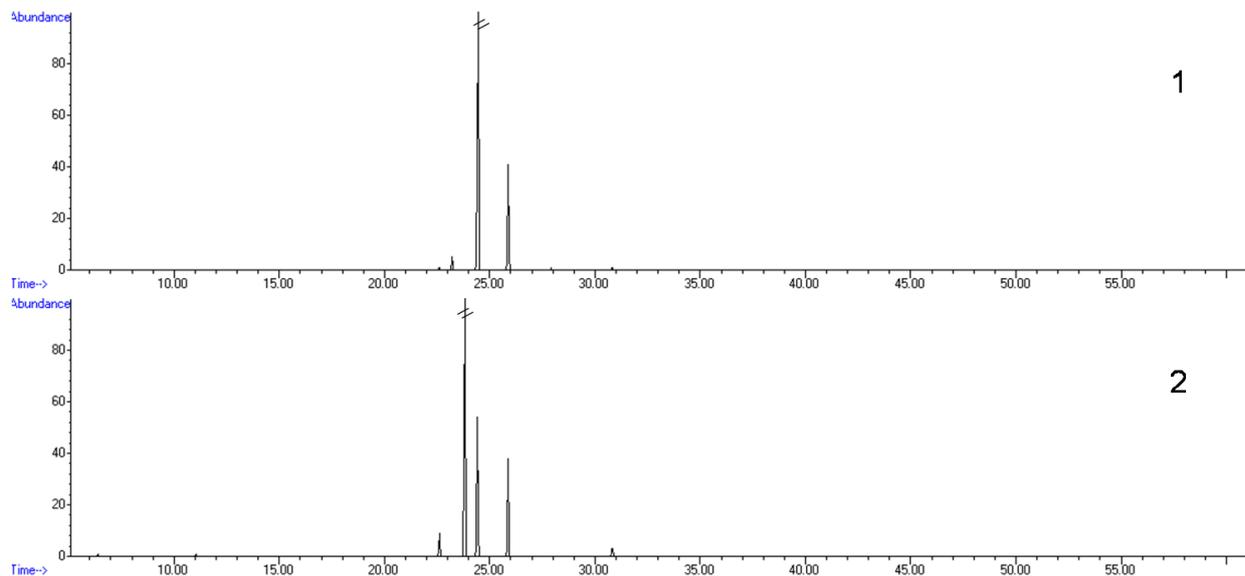


Figura 9 Cromatogramas dos perfis de compostos voláteis obtidos por *Headspace* (HS-CG/EM) que exemplificam as diferenças entre os agrupamentos de *Echinodorus subalatus*. 1- SJP (São João da Ponte) e 2- MC4 (Montes Claros)

Caracterização fenológica

Para a espécie *E. floribundus*, o evento brotamento foi classificado como assíncrono durante os meses de janeiro, março, abril, maio, novembro e dezembro de 2018 (Figura 10 A). Nos demais meses, a fenofase foi considerada como pouco síncrona, com atividade máxima de 38% dos indivíduos da população manifestando o evento de brotação no mês de outubro de 2018. A brotação se apresentou mais intensa nos indivíduos durante os meses de setembro de 2017 e junho de 2018, com picos de intensidade de 0,44 brotamentos por indivíduo da população (Figura 10 B). Pode-se considerar a atividade da fenofase folha jovem como pouco síncrona durante o estudo, porém, excepcionalmente, no mês de setembro de

2017 houve alto sincronismo, com 64% dos indivíduos manifestando este evento e intensidade máxima, com produção de 36 folhas jovens na população do banco de germoplasmas (Figura 10 A e B). A ocorrência desses picos em mesmo período aponta que há simultaneidade entre os mesmos. A fenofase folhas maduras apresentou atividade contínua e com alta sincronia durante todo estudo, diferente das demais fenofases vegetativas (Figura 10 A). Já a fenofase queda foliar apresentou durante o período de outubro de 2017 a abril de 2018, alto sincronismo dos indivíduos do banco de germoplasma e ausência de sincronismo em setembro de 2018 (Figura 10 A). O pico e intensidade máxima ocorreram em dezembro de 2017 (4,07 folhas em senescência por indivíduo da população) (Figura 10 A).

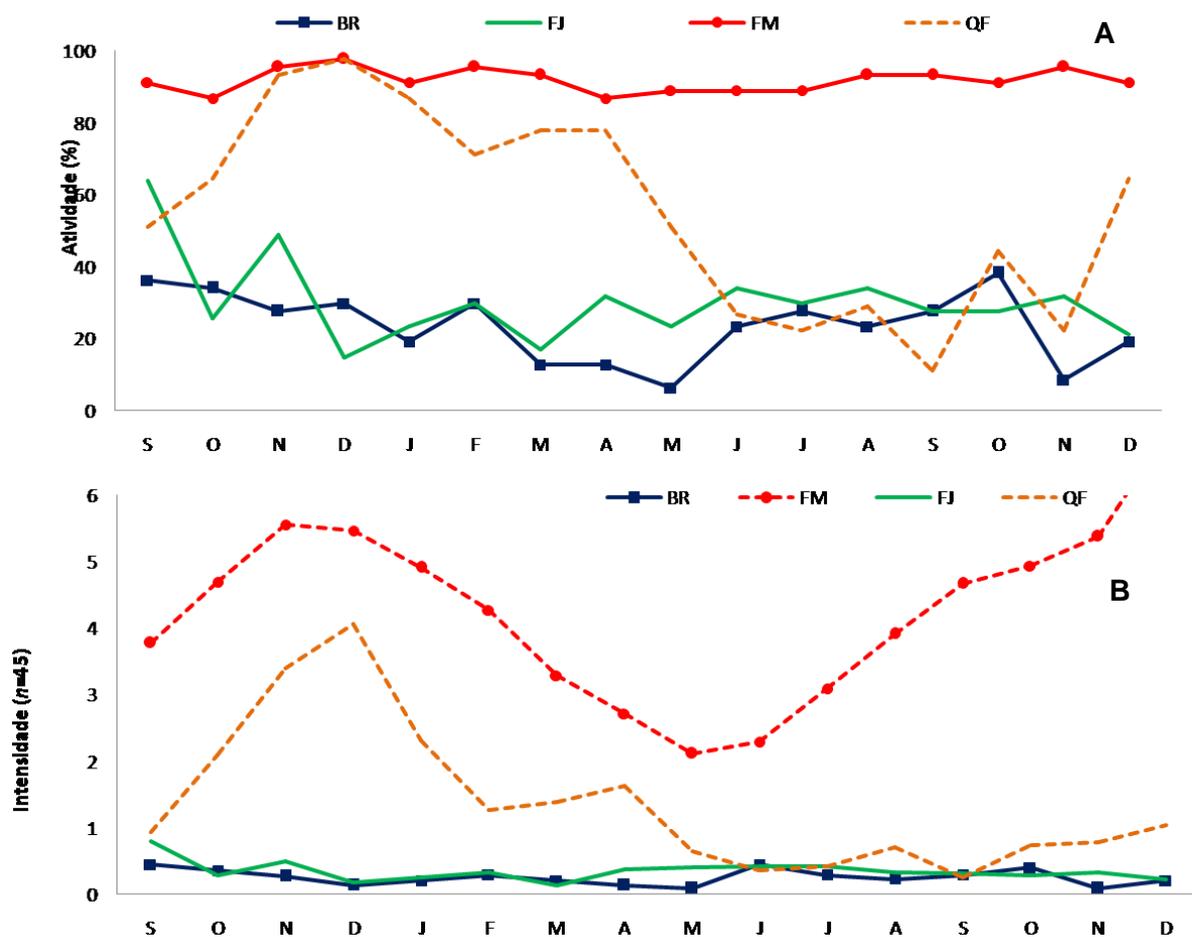


Figura 10 Atividade e intensidade das fenofases vegetativas brotamento (BR), folhas jovens (FJ), folhas maduras (FM) e queda foliar (QF) em *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. em cultivo no período de setembro de 2017 a dezembro de 2018. Eixo horizontal representa os meses de estudo

Para a espécie *E. subalatus*, a fenofase brotamento foi assíncrona durante o período de maio a julho de 2018; pouco síncrona durante setembro de 2017, de novembro de 2017 a abril de 2018 e em agosto de 2018; e muito síncrona em outubro de 2017 e de setembro a dezembro de 2018, com pico de intensidade de 0,88 brotamentos por indivíduo da população, em outubro de 2018 (Figura 11). A fenofase folha jovem apresentou três períodos de alto sincronismo, sendo eles de outubro a dezembro de 2017, fevereiro a março de 2018 e de setembro a dezembro de 2018. Nos demais meses houve pouco

sincronismo entre os indivíduos para esse evento (Figura 11 A). O pico de intensidade de produção de folhas jovens dos indivíduos de *E. subalatus* ocorreu em setembro de 2017, com 1,5 folhas jovens produzidas por indivíduo, em período caracterizado como pouco síncrono (Figura 11 B). Com exceção do mês de setembro de 2017, em que houve baixo sincronismo para a produção de folhas maduras, este evento foi contínuo e de alto sincronismo ao longo do estudo (Figura 11 A). Já a intensidade máxima de produção de folhas maduras deu-se em novembro de 2018, com picos de produção de 14,58 folhas maduras por indivíduo da população (Figura 11 B). Os períodos em que houve maior proporção de indivíduos com queda foliar foram de novembro de 2017 a janeiro de 2018, entre 86% a 94%, janeiro de 2018, com 88% e dezembro de 2018, com 80% dos indivíduos de *E. subalatus* apresentando esse evento (Figura 11 A). O pico de intensidade da fenofase queda foliar deu-se no mês de dezembro de 2018 (Figura 11 B).

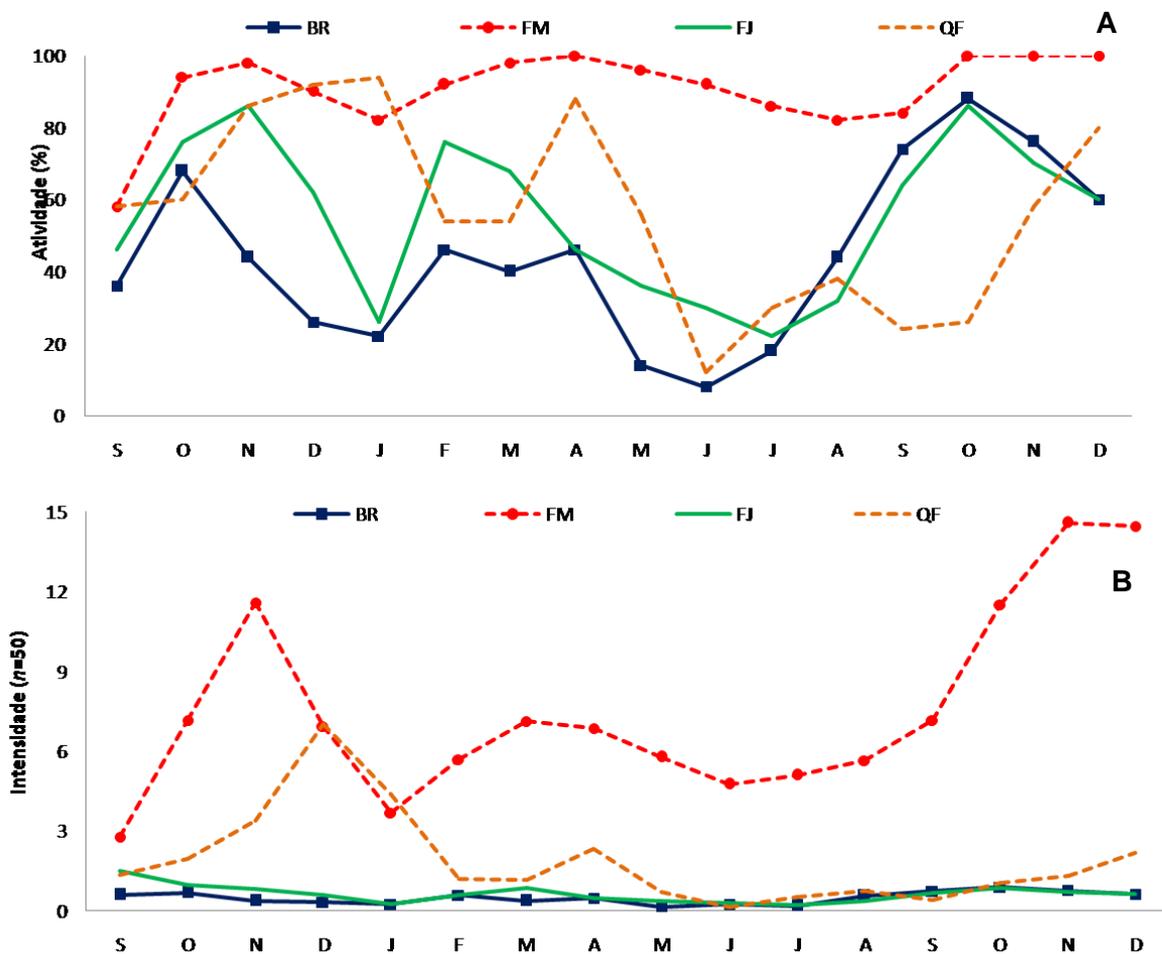


Figura 11 Atividade e intensidade das fenofases vegetativas brotamento (BR), folhas jovens (FJ), folhas maduras (FM) e queda foliar (QF) em *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. em cultivo no período de setembro de 2017 a dezembro de 2018. Eixo horizontal representa os meses de estudo

Para *E. floribundus* foi possível observar que todos os eventos fenológicos das fenofases reprodutivas foram assíncronos (Figura 12 A). A produção de botões florais ocorreu em apenas três

momentos durante o estudo, de outubro a dezembro de 2017, em setembro de 2018 e de novembro a dezembro deste mesmo ano (Figura 12 B). O pico em que ocorreu maior proporção de indivíduos da população foi em outubro de 2017, com apenas 7% dos indivíduos (Figura 12 A). Houve simultaneidade entre a atividade e intensidade. O pico de intensidade ocorreu no mês de novembro de 2018, com produção de 44 botões florais na população (Figura 12). Houve floração nos meses de novembro e dezembro de 2017; setembro, novembro e dezembro de 2018 (Figura 12). Em cada um deles a proporção de indivíduos que floresceram foi de 2% da população (Figura 12 A). Os picos de floração ocorreram nos meses de setembro e dezembro de 2018, nos quais foram produzidas três flores (Figura 12 A). A produção de flores secas em 2017 ocorreu nos meses de novembro e dezembro de 2017, por cerca de 4% e 2% da população, respectivamente (Figura 12 A). Em 2018, a fenofase flores secas ocorreu entre os meses de setembro a dezembro, atingindo pico de atividade em novembro de 2018, em que 4% dos indivíduos de *E. floribundus* manifestaram este evento (Figura 12 A). O período de maior intensidade do evento na população foi durante o mês de setembro de 2018, com produção total de 1,07 flores secas por indivíduo da população (Figura 12 B). A floração e as flores secas produzidas no mês de novembro de 2017 deram origem aos frutos imaturos que foram produzidos durante os meses de novembro de 2017 a janeiro de 2018 (Figura 12 B). Houve um segundo período de frutos imaturos que ocorreu em 2018, durante os meses de outubro a dezembro, sendo originados provavelmente, da floração e das flores secas produzidas entre os meses de setembro a dezembro (Figura 12 B). Os períodos de novembro a dezembro de 2017 e novembro a dezembro de 2018 obtiveram as maiores proporções de indivíduos manifestando o evento frutos imaturos, com 4% do total de indivíduos de *E. floribundus* (Figura 12 A). A produção de frutos imaturos ocorreu em maior intensidade no mês de novembro de 2017, com 2,71 frutos imaturos por indivíduo (Figura 12 B). O período de atividade para a fenofase frutos maduros no ano de 2017 deu-se em dezembro e se estendeu até janeiro de 2018 (Figura 12 B). Nos meses de outubro e dezembro 2018, houve um novo período de produção de frutos maduros. Observando a produção de frutos maduros em ambos os períodos, percebeu-se que nos meses de dezembro de 2017 e dezembro de 2018 foi alcançada a proporção máxima de 4% do número total de indivíduos da população que apresentaram este evento (Figura 12 A). O pico de atividade dessa fenofase ocorreu em dezembro de 2017, posterior ao pico de atividade da fenofase frutos imaturos, com a produção de 2,53 frutos maduros por indivíduo (Figura 12 B).

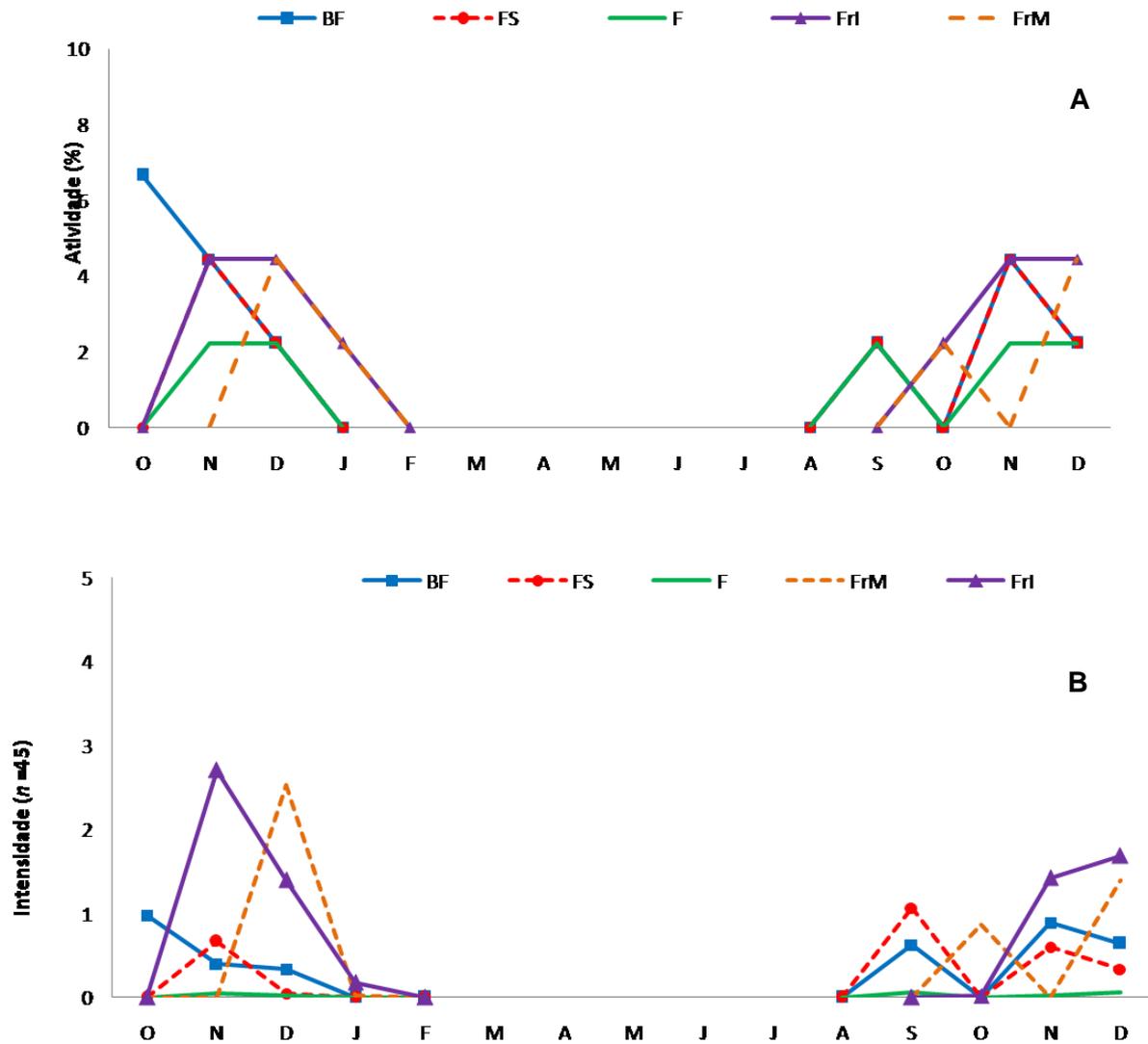


Figura 12 Atividade e intensidade das fenofases reprodutivas botões florais (BF), floração (F), flores secas (FS), fruto imaturo (FrI) e fruto maduro (FrM) em *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. em cultivo no período de setembro de 2017 a dezembro de 2018. Eixo horizontal representa os meses de estudo

Para a fenologia reprodutiva da espécie *E. subalatus* foi possível observar que as fenofases botões florais, floração, flores secas e frutos imaturos obtiveram comportamento semelhante ao longo do período do estudo, com dois períodos síncronos de atividade (Figura 13 A). O primeiro ocorreu de novembro a dezembro de 2017, para a fenofase botões florais, e, em dezembro de 2017, para as fenofases floração, flores secas e fruto imaturo (Figura 13 A). O início do segundo período síncrono, que ocorreu em 2018, deu-se no mês de outubro para as fenofases botões florais e floração (Figura 13 A). O término deste período ocorreu em dezembro para a fenofase botões florais e em novembro para a floração (Figura 13 A). Para as fenofases frutos imaturos e frutos maduros, o segundo período síncrono ocorreu durante os meses de novembro e dezembro de 2018 (Figura 13 A). Já a fenofase frutos maduros, apresentou período de atividade pouco síncrono de dezembro de 2017 a março de 2018 (Figura 13 A). Nos demais meses de estudo a atividade foi assíncrona (Figura 13 A). O pico máximo de atividade ocorreu no mês de janeiro de 2018, com 44% dos indivíduos apresentando os eventos da fenofase frutos maduros (Figura 13 A). O pico

de maior intensidade para a fenofase frutos imaturos ocorreu no mês de dezembro de 2017, com a produção de 52,78 frutos imaturos por indivíduos da população, e refletiu, posteriormente, na produção de frutos maduros em janeiro de 2018, mês em que ocorreu maior produção de frutos maduros (13,96 frutos maduros por indivíduo) (Figura 13 B). Foram produzidos botões florais e flores em alta intensidade em novembro de 2018 (45 botões florais e 5 flores por indivíduo da população, respectivamente) que, no mês posterior, repercutiu em pico de maior intensidade para a fenofase flores secas (97,02 flores secas por indivíduo) (Figura 13 B).

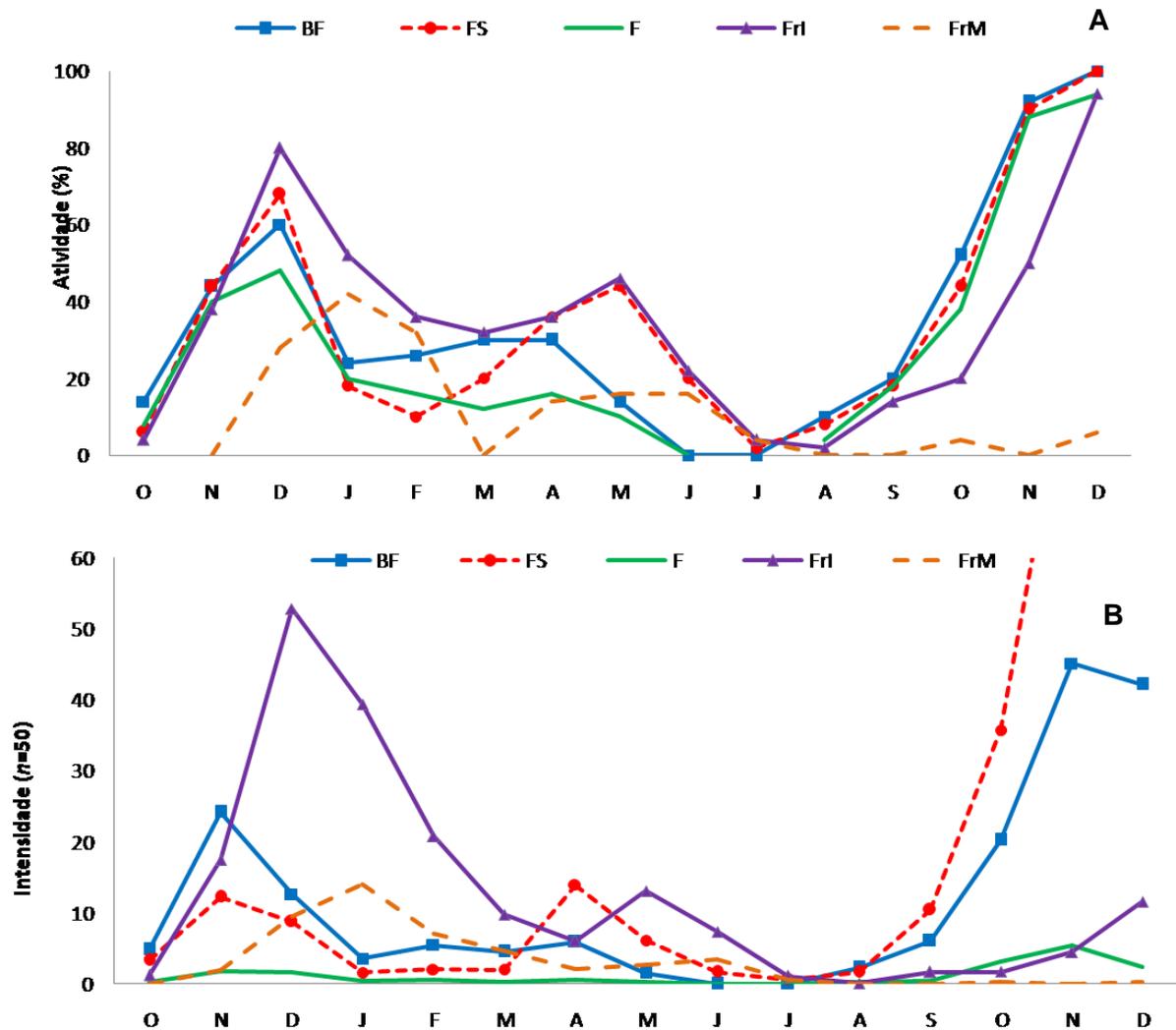


Figura 13 Atividade e intensidade das fenofases botões florais (BF), floração (F), flores secas (FS), fruto imaturo (FrI) e fruto maduro (FrM) em *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb. em cultivo e precipitação média em Montes Claros no período de setembro de 2017 a dezembro de 2018. Eixo horizontal representa os meses de estudo

DISCUSSÃO

Morfologicamente, os descritores limbo foliar, ápice e base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar poderão ser utilizados para auxiliar a diferenciação das espécies *E. floribundus* e *E. subalatus*, uma vez que ambas as espécies são utilizadas pela população sem nenhuma distinção. Ressalta-se ainda a importância da variação interespecífica observada para os demais descritores morfológicos, que podem contribuir para o processo de domesticação das espécies. A exemplo disso, há o hábito de crescimento ereto, que na cultura do feijão proporciona maior produtividade quando cultivada com espaçamentos menores entre fileiras (DREHMER, 2015). Acrescido a isso, autores afirmam que a variação durante o processo de domesticação é importante para enfrentar as flutuações ambientais futuras e permitem o melhoramento e a obtenção de genótipos superiores (MARTINS, 2014).

Quimicamente, referindo-se aos compostos voláteis, é possível observar similaridade das espécies *E. floribundus* e *E. subalatus* com as *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, as quais apresentam os compostos (*Z*)-beta-cariofileno e (*E*)-beta-cariofileno (PIMENTA, FIGUEIREDO & KAPLAN, 2006; COELHO et al., 2013; SILVA et al., 2013), o que reafirma a homogeneidade interespecífica do gênero (REGO, 1988 apud POTT, 2018, p.118). Lehtonen (2007) sugere que, embora não haja estudos publicados sobre esse fenômeno, as respostas semelhantes de espécies de *Echinodorus* podem ser advindas das semelhanças ecológicas que estas apresentam. Porém a identificação correta, pelo nome científico, de plantas medicinais, faz-se necessária, pois a variação dos nomes populares, de acordo com região, pode levar ao uso de espécies com princípios ativos diferentes, levando até mesmo a um quadro de intoxicação (CORRÊA JUNIOR & SCHEFFER, 2013).

Os dendrogramas gerados nas análises de dissimilaridade dos descritores morfológicos e do perfil dos compostos voláteis representam, de forma bidimensional, os agrupamentos entre amostras similares, com base na análise estatística das variáveis disponíveis (NETO & MOITA, 1998). O número elevado de grupos formados para ambas as espécies, tanto para os descritores morfológicos, quanto para o perfil dos compostos voláteis, demonstra que há diversidade em nível de acesso para *E. floribundus* e *E. subalatus*. Essa diversidade representa a variação intraespecífica comum a espécies do gênero *Echinodorus* (REGO, 1988 apud POTT, 2018, p.118). Em alguns casos, ela se dá como estratégia adaptativa às alterações ambientais (PIMENTA, 2002; NEVES, 2007). A diversidade química, observada em ambas as espécies, pode ser vista como fonte de descoberta de novas drogas, uma vez que esta se apresenta como excelente espectro do espaço multivariado de trabalho (LEITÃO, MONTANARI & DONNICI, 2000).

A proximidade química entre os perfis de compostos voláteis dos acessos de *E. subalatus*, coletados em mesma cidade, mas de locais diferentes, pode estar relacionada à distância de voo de seus polinizadores, possibilitando o compartilhamento de material genético entre as populações. A principal abelha polinizadora de *E. subalatus* é a *Protodiscelis alismatis* (CARVALHO & SCHLINDWEIN, 2011), endêmica da Caatinga e que, aparentemente, realiza a coleta de pólen somente em espécies do gênero *Echinodorus* (ZANELLA, 2003; CARVALHO 2012).

Tendo em vista que as espécies de chapéu-de-couro são alvo de extrativismo, com a coleta de suas folhas para suprir as demandas de mercado, baseados nos resultados obtidos no estudo fenológico, algumas orientações quanto às coletas de folhas são necessárias. Para a espécie *E. floribundus*, não é recomendada a coleta de folhas maduras no período de outubro a abril, pois, apesar da produção de folhas

maduras ser contínua ao longo do ano, esse período representa a época em que há maior senescência foliar entre os indivíduos desta espécie, concomitante, morte foliar.

Outro aspecto importante a se considerar é que, a produção de brotos foliares e folhas jovens não é regular. Dessa forma, no momento da coleta, devem ser coletadas apenas folhas maduras, para que se tenha material disponível ao longo dos meses. Assim como em *E. floribundus*, a produção de folhas maduras em *E. subalatus* é contínua, porém, deve-se evitar a coleta no período de novembro a janeiro, em que ocorre maior senescência. De acordo com KAUL (1985), que estudou o comportamento fenológico de espécies anuais e perenes pertencentes à Alismataceae, no estado do Nebraska, Estados Unidos, a senescência em espécies anuais é comum, mesmo em condições de estufa, porém as plantas vão apresentar períodos de crescimento mais longos do que em seu hábitat natural. As orientações de coleta devem ser levadas em consideração, uma vez que não há no Brasil nenhum manual de recomendação de boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de *Echinodorus* sp., como existe para algumas espécies nativas, tais como pequi (*Caryocar brasiliense*), mangaba (*Hancornia speciosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth) e umbu (*Spondias tuberosa*) (BARRETO, 2010; BARRETO & CASTRO, 2010; LIMA & SCARIOT, 2010; OLIVEIRA & SCARIOT, 2010; SAMPAIO, 2011; FILIZOLA, 2013). Ressalta-se ainda que a exploração desordenada pode levar à escassez dos recursos genéticos (BORGES FILHO & FELFILI, 2003; LOURENZANI, LOURENZANI & BATALHA, 2004), porém, quando há a prática sustentável do extrativismo, além de gerar fonte de renda, torna-se instrumento de conservação do ecossistema (BARRETO & CASTRO, 2010).

A floração em *E. floribundus* ocorreu entre os meses de setembro a dezembro e em *E. subalatus* de outubro a dezembro. Joaquim et al. (2010), ao trabalhar com *E. grandiflorus* observou floração no período de outubro a março, com maior intensidade de novembro a janeiro. A interrupção na floração, observada entre os meses de fevereiro a julho para *E. floribundus* e, em julho, para *E. subalatus*, é comum nas espécies do gênero, observada no período do inverno (junho a setembro) para *E. grandiflorus* por Rego (1988), no Rio Grande do Sul, e Vieira e Lima (1997), em Viçosa (MG). Esses períodos de interrupção e retomada do florescimento das espécies de *Echinodorus* são característicos do padrão cíclico de monocotiledôneas perenes com a presença de rizomas (PIMENTA, 1993).

Por meio deste estudo conclui-se que há similaridade química e fenológica das espécies estudadas com as descritas na literatura, porém ocorrem variações interespecíficas no perfil químico de voláteis e em alguns descritores morfológicos, sendo recomendada a utilização apenas dos descritores limbo foliar, ápice e base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar para diferenciação entre as duas espécies.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À FAPEMIG e pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. Academic press, 2012.
- ARAÚJO, E. S. et al. Riqueza e diversidade de macrófitas aquáticas em mananciais da Caatinga. **Diálogos & Ciência**, v. 32, n. 1, p. 229-234, 2012.
- ARAÚJO, L. E. et al. Bacias hidrográficas e impactos ambientais. **Qualitas Revista Eletrônica**, v. 8, n. 1, 2009.
- AUGUSTIN, C. H. R. R.; DE MELO, D. R.; ARANHA, P. R. A. **Aspectos da evolução geomorfológica de veredas no norte de Minas Gerais-Brasil**. Disponível em: < <http://sie.unb.br/ugb/sinageo/7/0332.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2019.
- BARRETO, L. S.; CASTRO, M. S. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do umbu**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 64 p.
- BENCKE, C. S. C.; MORELLATO, L. P. C. Estudo comparativo da fenologia de nove espécies arbóreas em três tipos de floresta atlântica no sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 237-248, 2002.
- BOLSON, M. et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015.
- BORGES FILHO, H. C.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa- MG, v. 27, n. 5, 2003.
- CANALLI, Y. M.; BOVE, C. P. Flora do Rio de Janeiro: Alismataceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. ç, 2017.
- CARVALHO, A. T. **Interações entre *Protodiscelis* (*Colletidae*, *Neopasiphaeinae*) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores**. 133 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- CARVALHO, A. T; SCHLINDWEIN, C. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. **Biological Journal of the Linnaean Society**, v. 102, n. 2, p. 355-368, 2011.
- COELHO, M. G. P. et al. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, p. 245-251, 2013.
- CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Boas práticas agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Curitiba, Emater, 2009, 54 p.

DREHMER, M. H. **Arranjos e populações de plantas e sua influência em características agrônomicas e na produtividade de feijão**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

FILIZOLA, B. C. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da fava-d'anta**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2013. 76 p.

FONT-QUER, P. **Diccionario de botánica**. Barcelona: Editorial Labor, 1963, 1244 p.

GARCIA, E. F. *et al.* In vitro TNF- α inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. **Planta Médica**, v. 82, n. 04, p. 337-343, 2016.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. J. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2007, 544 p.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. Notes on *Echinodorus* (Alismataceae). **Brittonia**, v. 38, n. 4, p. 325-332, 1986.

INMET (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA). **Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt.php?&mRelEstacao=83437&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=30/10/2017&mRelDtFim=30/12/2018&mAtributos=,1,1,1,1,1,>. Acesso em: 15 jul. 2019.

IPGRI. **Descriptors for Black pepper (*Piper nigrum* L.)**. Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute, 23 –32. p. 1995.

LEHTONEN, S. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. **Kew Bulletin**, v. 63, n. 4, p. 525-563, 2008.

LEITAO, A.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Sobre o uso de métodos quimiométricos em química combinatória. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 178-184, 2000.

LIMA, I. L. P.; SCARIOT, A. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da Mangaba**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 37 p.

LIMA-DELLAMORA, E. C. *et al.* Genotoxic Maillard byproducts in current phytopharmaceutical preparations of *Echinodorus grandiflorus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1385-1394, 2014.

LOPES, O. D. *et al.* Determinação do coeficiente de cultura (Kc) e eficiência do uso de água do alecrim-pimenta irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 15, n. 6, 2011.

LOURENZANI, A. E. B. S.; LOURENZANI, W. L.; BATALHA, M. O. Barreiras e oportunidades na

comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 3, p. 15-25, 2004.

MARTINS, E. R. Domesticação de plantas medicinais e aromáticas: caminhos. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 53. **Anais...** Palmas: ABH, 2014. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_7/Ernane.pdf>. Acesso em: 04 Out. 2019.

MATIAS, L. Q. **Alismataceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB39938>>. Acesso em: 01 Jun. 2019.

MONTEIRO, A. P. **Produção de cervejas especiais adicionadas de extratos solúveis de ervas nativas com propriedades antioxidantes.** 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

NASCIMENTO, E. L. D. *et al.* Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, n. 1, p. 12-17, 2014.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NEVES, A. C. O. **Plasticidade morfológica, alometria e dinâmica populacional de *Echinodorus paniculatus* Micheli (Alismataceae) em resposta ao regime de cheia e seca do Pantanal, sub-regiões de Miranda e Abobral.** 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, 2007.

NIST. **Mass Spectral Library: NIST Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0 d).** 2005.

OLIVEIRA, W. L.; SCARIOT, A. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 84 p.

PEDRALLI, G. Macrófitos aquáticos: técnicas e métodos de estudos. **Estudos de Biologia**, v. 26, p. 5-24, 1990.

PIMENTA, D. S. **Contribuição à ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro).** 2002. 179 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 623-628, 2006.

PORTELLA, V. G. *et al.* Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Nephron Extra**, v. 2, n. 1, p. 177-183, 2012.

POTT, V. J. *et al.* Lista de Alismatales do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 73, p. 117-122, 2018.

PRANDO, T. B. L. *et al.* Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249-1258, 2016.

RADFORD, A. E. **Fundamentals of plant systematics**. New York, NY, Harper & Row, 1986, 498 p.

ROCHA, C. G.; RESENDE, U. M.; LUGNANI, J. S. Diversidade de macrófitas em ambientes aquáticos do IPPAN na Fazenda Santa Emília, Aquidauana-MS. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 456-458, 2007.

SAMPAIO, M. B. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do buriti**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2011. 80 p.

SILVA, G. P. *et al.* Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1584-1596, 2016.

SILVA, T. M. *et al.* Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 22-26, 2012.

TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2017.

TRINDADE, C. R. *et al.* Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do Campus Carreiros-FURG, Rio Grande, RS. 2010. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/handle/1/436>>. Acesso em: 16 set. 2019.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963

VAZ, M. S. M. *et al.* Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of ethanol extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves in vivo. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 32-38, 2016.

VIANA, S. M. **Riqueza e distribuição de macrófitas aquáticas no rio Monjolinho e tributários (São Carlos, SP) e análise de sua relação com variáveis físicas e químicas**. 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

VIEIRA, M. F.; LIMA, N. A. S. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). **Aquatic botany**, v.

58, n. 2, p. 89-98, 1997.

ZANELLA, F. C. V. Abelhas da Estação Ecológica do Seridó (Serra Negra do Norte, RN): aportes ao conhecimento da diversidade, abundância e distribuição espacial das espécies na caatinga. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: Editora UNESC, 2003. p. 231-240, 2003.

4.2. Artigo 2 – Marcadores químicos em espécies de *Echinodorus* (Alismataceae) utilizadas como chapéu-de-couro

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

RESUMO

O nome chapéu-de-couro é dado às plantas pertencentes ao gênero *Echinodorus* (Alismataceae). Essas são nativas e popularmente utilizadas como diuréticas e anti-inflamatórias. As espécies *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* têm o uso recomendado pela Farmacopeia Brasileira. Entretanto, devido à plasticidade fenotípica do gênero, a identificação precisa é dificultada, conseqüentemente, *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* têm sido utilizadas pela população para os mesmos fins. O objetivo do presente trabalho foi analisar a composição química, avaliar marcadores químicos para as espécies *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* e a similaridade química dessas com as espécies descritas na Farmacopeia Brasileira. A triagem fitoquímica revelou presença de fenóis, flavonoides, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e triterpenoides nos extratos. Porém, ambas as espécies apresentaram valores inferiores de flavonoides e fenóis totais quando comparadas com outras espécies do gênero descritas na literatura. A caracterização do extrato aquoso foliar em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) detectou 118 e 121 compostos em *E. floribundus* e *E. subalatus*, respectivamente. Destes, 25 apresentaram espectros UV-Vis característicos de compostos fenólicos. Não foram detectados os marcadores ácido chicórico e isoorientin, comuns em *Echinodorus*. Os teores de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico para *E. floribundus* e *E. subalatus* (5,52% e 3,07%, respectivamente) foram superiores ao que é exigido pela Farmacopeia Brasileira. Dessa forma, conclui-se que flavonoides e fenóis estão presentes em *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* em menores concentrações do que nas espécies de *Echinodorus* descritas na literatura e há similaridade das espécies estudadas com as descritas pela Farmacopeia Brasileira, com potencial uso medicinal.

Palavras-chave: Farmacopeia Brasileira. Flavonoides e fenóis. Ácido *o*-hidroxicinâmico. Perfil cromatográfico.

ABSTRACT

The name “chapéu-de-couro” is given to plants belonging to the genus *Echinodorus* (Alismataceae). These are native and popularly used as diuretics and anti-inflammatory. The species *E. macrophyllus* and *E. grandiflorus* have the recommended use by the Brazilian Pharmacopoeia. However, due to the phenotypic plasticity of the genus, precise identification is difficult, therefore, *E. floribundus* and *E. subalatus* have been used by the population for the same purposes. The aim of the work was to analyze the chemical composition, to evaluate chemical markers for the species *E. floribundus* and *E. subalatus* and their chemical similarity with the species described in the Brazilian Pharmacopoeia. Phytochemical screening revealed the presence of phenols, flavonoids, flavones, flavonols, xanthones, steroids and triterpenoids in the extracts. However, both species presented lower values of flavonoids and total phenols when compared with other species of the genus described in the literature. The characterization of aqueous leaf extract in high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) detected 118 and 121 compounds in *E. floribundus* and *E. subalatus*, respectively. Of these, 25 showed characteristic UV-Vis spectra of phenolic compounds. Markers chicory acid and isoorientin, present in *Echinodorus*, weren't detected. The levels of *o*-hydroxycinnamic acid derivatives for *E. floribundus* and *E. subalatus* (5.52% and 3.07%, respectively) were higher than required by the Brazilian Pharmacopoeia. Thus, that flavonoids and phenols are present in *E. floribundus* and *E. subalatus* in lower concentrations there is similarity among the species studied and those indicated by the Brazilian Pharmacopoeia.

Keywords: Brazilian Pharmacopoeia. Flavonoids and phenols. *o*-hydroxycinnamic acid. Chromatographic profile.

INTRODUÇÃO

O chapéu-de-couro [*Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub. e *Echinodorus subalatus* (Mart.) Griseb.] pertencente à família Alismataceae, é predominantemente encontrado na região tropical da América do Sul (Matias; Soares, 2009; Tabosa; Matias; Martins, 2012). Presente no território brasileiro, como nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, são encontradas em lagoas temporais e depressões úmidas, pântanos, em savanas e planícies inundadas (Lehtonen, 2008; Silva; Bastos; Takahashi, 2010; Moro; De Sousa; Matias, 2014; Oliveira; Bove, 2016).

As folhas de espécies de chapéu-de-couro são utilizadas como matéria-prima no preparo de refrigerantes, o produto à base de chapéu-de-couro e erva-mate foi criado na década de 1940, com o intuito de se obter bebida de paladar agradável a partir de extratos vegetais (Lima-Dellamora *et al.*, 2014; Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas, 2018). A adição do extrato aquoso de chapéu-de-couro também tem sido estudada para adicionar à cerveja ale, visando obter bebida com características sensoriais diferenciadas e elevada atividade antioxidante (Monteiro, 2016).

As plantas de chapéu-de-couro também são importantes para a indústria de ornamentação, várias espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* são importadas para países da Europa para fins de decoração de aquários e lagos (Brunel, 2009). No âmbito ambiental, o chapéu-de-couro é uma planta eficiente na fitorremediação de chumbo a níveis de traços (Barbosa *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015) e pode ser utilizada na descontaminação de aquíferos poluídos (Ying *et al.*, 2014; Wan-Ru *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, as folhas de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* são utilizadas na medicina popular (Portella *et al.*, 2012), no tratamento de doenças do sistema gastrointestinal e doenças relacionadas com obstetrícia, ginecologia e do trato urinário (Bolson *et al.*, 2015). De acordo com Dias *et al.* (2013), a espécie *E. macrophyllus* teve o seu uso recomendado na Farmacopeia Brasileira 1ª edição, de 1926, e na Farmacopeia Brasileira 2ª edição, de 1959. Já a espécie *E. grandiflorus* foi introduzida na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010) e se manteve na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, como a espécie da qual é obtida a droga vegetal do chapéu-de-couro (Brasil, 2019). Para ambas as espécies já foram confirmadas atividades biológicas com propriedades diurética, antinecrótica, tumoral, anti-inflamatória e capacidade de interromper ou pelo menos retardar lesões renais (Portella *et al.*, 2012; Prando *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016b; Garcia *et al.*, 2016a; Silva *et al.*, 2016).

Alguns compostos como diterpenos, alcaloides, glicosídeos, óleos essenciais, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos e derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico (Kobayashi *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2016) foram isolados nas espécies *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*. Dentre esses, os flavonoides são indicados como responsáveis ou em sinergia com outros compostos pelas atividades biológicas comprovadas, destacando-se os flavonoides *swertisin*, *isoorientin*, *swertiajaponine* e *isovitexin* e os ácidos fenólicos como ácido *trans*-aconítico e ácido chicórico (Tanus-Rangel *et al.*, 2010, Lima-Dellamora *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Strada, 2017). Porém, não se conhece sobre o perfil químico das espécies *E. floribundus* e *E. subalatus*, utilizadas como chapéu-de-couro no Norte de Minas e Vale do Jequitinhonha.

Um dos maiores problemas apresentado pelo gênero *Echinodorus* é a dificuldade de classificação precisa de espécies, advinda da plasticidade fenotípica associada à baixa quantidade de estruturas morfológicas convergentes (Lehtonen; Myllys, 2008). Razão pela qual é comum encontrar na literatura

autores que consideram a espécie *E. floribundus* como sinonímia a *E. grandiflorus* ssp. *aureus* (Haynes; Holm-Nielsen, 1986; Haynes; Holm-Nielsen, 1994) e autores que a classificam como espécie distinta (Rataj, 1969; Lehtonen, 2006; Lehtonen, 2008; Lehtonen; Myllys, 2008).

Frente ao exposto, a ampliação dos estudos químicos com as demais espécies utilizadas pela população faz-se necessária, a fim de garantir o uso seguro das mesmas, além de contribuir na obtenção de informações que auxiliem na identificação em nível de espécie e na produção de compostos vegetais biologicamente ativos de interesse da indústria de fitofármacos, o que pode cooperar no desenvolvimento de estudos de manejo, domesticação e conservação dessas espécies. O objetivo do presente trabalho foi analisar a composição química a fim de obter marcadores químicos para as espécies *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* e avaliar a similaridade química dessas com as espécies descritas pela Farmacopeia Brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Para a realização da coleta do material vegetal em campo, foi concedida pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), a autorização para pesquisa científica no estado de Minas Gerais, nº 041/2018, número do cadastro no SisGen: A97D542. Foram coletados nove acessos da espécie *Echinodorus floribundus* e seis acessos de *Echinodorus subalatus*, totalizando 15 acessos de ambas as espécies (Figura 1). Destas plantas foi estabelecida coleção de germoplasma em casa de vegetação, no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/ UFMG), Brasil, localizado nas coordenadas 16°40'58,5" de latitude sul, 43°50'25,6" de longitude leste de Greenwich e altitude de 626 metros. O clima da região é caracterizado como tropical típico, quente e semiúmido, com estação chuvosa curta (verão) e seca prolongada (inverno), bem definida. Esse clima é caracterizado como Aw, segundo a classificação de Köppen, ou seja, tropical, com chuvas de verão, temperaturas médias anuais entre 22 e 24°C e pluviosidade média anual entre 1000 e 1200 mm (Lopes et al. 2011).

A coleção de germoplasma foi formada com o plantio dos indivíduos de cada acesso em vasos de 5 dm³, utilizado como substrato a mistura solo:areia:esterco na proporção 3:2:1. O solo apresentou as seguintes características: textura argilosa, pH 7,3; P 360 mg dm⁻³; K 30 mg dm⁻³; Ca 4,30 cmolc dm⁻³; Mg 1,20 cmolc dm⁻³; H+Al 0,85 cmolc dm⁻³; SB 5,58 cmolc dm⁻³; t 5,58 cmolc dm⁻³; T 6,43 cmolc dm⁻³; V 87%, argila 12 dag kg⁻¹; matéria orgânica 2,57 dag kg⁻¹; carbono orgânico 1,49 dag kg⁻¹. A irrigação foi feita manualmente, com saturação do solo e intervalos de dois dias. Exsicatas foram confeccionadas para a identificação das espécies, as quais foram depositadas no Herbário MCCA do ICA/UFMG, com numeração MCCA 2595 e MCCA 3123. Amostras comerciais de chapéu-de-couro, identificadas como *Echinodorus macrophyllus* foram adquiridas no comércio de Montes Claros – MG, como padrão de referência.

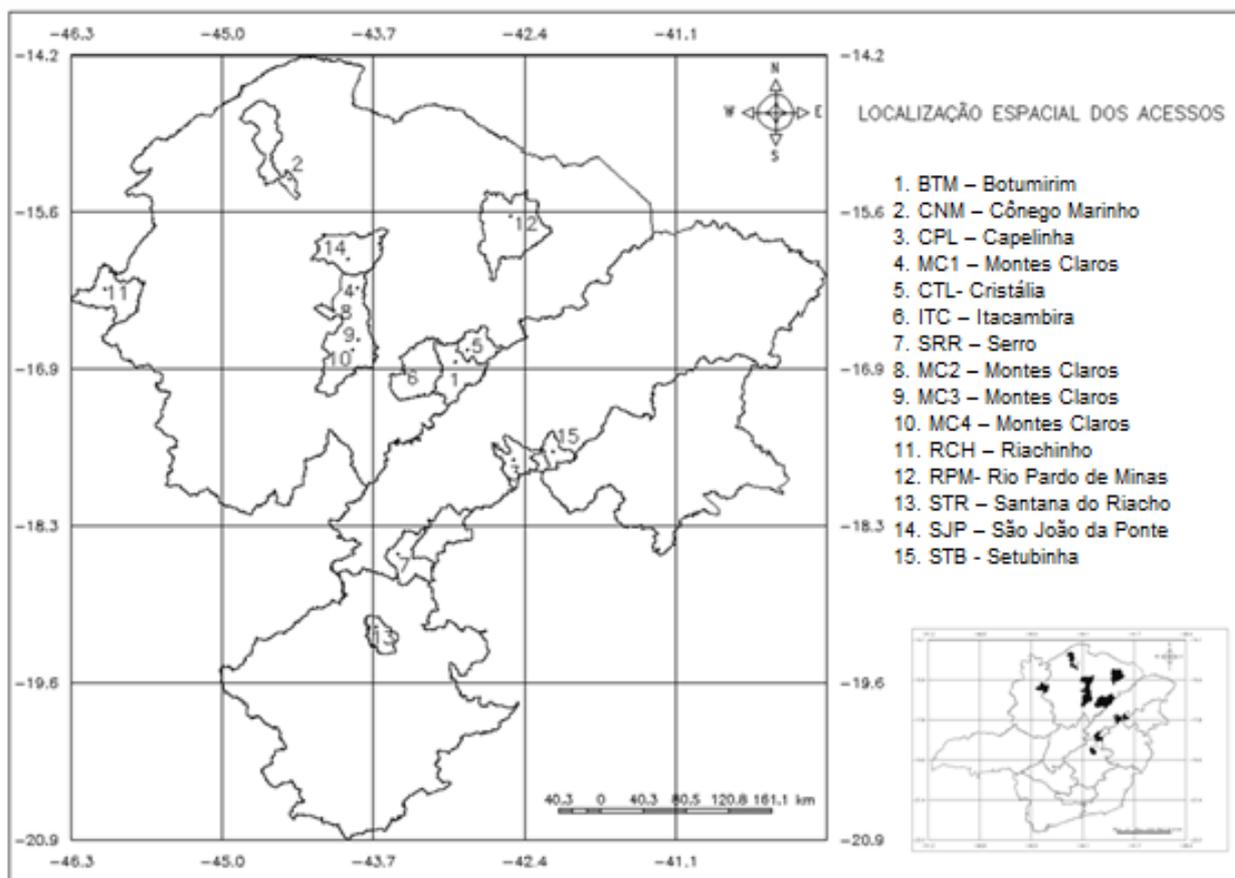


Figura 1 - Carta política das mesorregiões Norte, Vale do Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Metropolitana de Belo Horizonte, em Minas Gerais, Brasil, com pontos representando os 15 acessos de ocorrência de *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*

Fonte do mapa base: IBGE (2018).

TRIAGEM FITOQUÍMICA

O preparo dos extratos aquosos das espécies de *E. floribundus* e *E. subalatus* foi realizado a partir da pesagem de 0,36 g de folhas pulverizadas com nitrogênio líquido de cada acesso em Erlenmeyer, adicionado com água destilada (20 mL) e levados a banho-maria fervente (15 minutos). Após atingir temperatura ambiente, a mistura foi filtrada com papel filtro (26 μm) e os extratos foram armazenados em frascos âmbar, na concentração final de 18 g L⁻¹. Os testes de detecção utilizados para esses compostos foram com cloreto férrico e hidróxido de sódio. Alíquotas dos extratos aquosos foram transferidas para tubos de ensaio (3 mL), aos quais se acrescentaram cinco gotas de cloreto férrico a 2% e deixados em repouso sob temperatura ambiente. A presença dos flavonoides e fenóis pelo teste do cloreto férrico foi confirmada pela alteração da coloração dos extratos (Silva; Bizerra; Fernandes, 2018). Alíquotas dos extratos aquosos foram transferidas para tubos de ensaio (3 mL), aos quais foi acrescentada solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% (1 mL) e, posteriormente, foram agitados. A alteração na coloração do extrato confirma a presença dos flavonoides e fenóis (Silva; Bizerra; Fernandes, 2018).

O teste com o cloreto férrico, descrito anteriormente, também foi utilizado na detecção de taninos. Além desse, foram realizadas as reações com acetato neutro de chumbo e com solução de acetato de

cobre. Uma alíquota dos extratos aquosos (1mL) foi diluída na proporção 1:5 e transferida para tubos de ensaio, aos quais foram adicionadas duas gotas de acetato neutro de chumbo a 10% em repouso sob temperatura ambiente. Outra alíquota dos extratos aquosos (1 mL) foi diluída na proporção 1:5, transferida para tubos de ensaio e adicionadas duas gotas de solução aquosa de acetato de cobre em repouso, sob temperatura ambiente. A presença dos compostos foi confirmada pela formação de precipitado (Silva; Bizerra; Fernandes, 2018). Ainda, foram realizados os testes para detecção de antocianinas, antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteróides, triterpenos e saponinas (Matos, 1997) para a espécie *E. subalatus*, devido a maior disponibilidade de material vegetal.

FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Para o preparo dos extratos metanólicos utilizados nas análises, foram coletadas folhas frescas de cada acesso e pulverizadas com nitrogênio líquido. A 0,5 g de folhas pulverizadas, acrescentou-se 20 mL de água e foi levado ao banho-maria fervente por 15 minutos. Após atingir temperatura ambiente, foi realizada a filtração dos extratos com papel filtro (26 μm) e foram armazenados em frascos âmbar, com concentração final de 33,3 mg mL^{-1} para posteriores análises.

A quantificação de fenóis totais foi realizada, segundo Amorin et al. (2008), pelo método de Folin e Ciocalteu. O extrato metanólico das folhas de todos os acessos (1mL; 7,2 mg mL^{-1}) foi transferido para balão volumétrico (100 mL) e adicionado do reagente Folin-Ciocalteu (5 mL) e de carbonato de sódio (10 mL; 7,5 mg L^{-1} em água). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro Micronal B-582, a 760 nm. A curva de calibração foi preparada nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido tânico em água. O branco da reação foi preparado em balão volumétrico (100 mL), com adição do reagente Folin-Ciocalteu e do carbonato de sódio, nas proporções descritas anteriormente e aferiu-se o menisco com água. A equação obtida na curva de calibração foi utilizada para o cálculo da concentração de fenóis totais equivalentes, substituindo o y da equação pelos valores de absorbância das amostras, sendo expressos em mg equivalentes de ácido tânico.

A quantificação de flavonoides totais seguiu adaptação da metodologia de Peixoto Sobrinho et al. (2008). O extrato metanólico das folhas de todos os acessos (1mL; 7,2 mg mL^{-1}) foi transferido para balão volumétrico (25 mL) e adicionado ácido acético (0,6 mL) e cloreto de alumínio (0,5 mg mL^{-1} em metanol), sendo o volume aferido com metanol. O branco da reação foi preparado em balão volumétrico (25 mL), com adição do ácido acético e do cloreto de alumínio, nas proporções descritas anteriormente e aferiu-se o menisco com metanol. Após repouso de 30 minutos a 25°C, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Micronal B-582) a 410 nm. A curva de calibração utilizada foi preparada nas concentrações de 20,0; 34,0; 48,0; 62,0 e 76,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rutina. Da mesma forma, a equação obtida na curva de calibração foi utilizada para o cálculo da concentração de flavonoides totais equivalentes, substituindo o y da equação pelos valores de absorbância das amostras. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por g de folha.

ANÁLISE DO EXTRATO FOLIAR

Foram coletadas folhas dos acessos de *E. floribundus* (BTM, CNM, CPL, CTL, ITC e STR) e *E. subalatus* (MC1, MC2, MC4 e SJP), separadas em pecíolos e limbos para higienização, as partes vegetais foram lavadas com água destilada. As folhas de cada acesso foram pesadas (20 g), transferidas para almofariz de porcelana e maceradas com nitrogênio líquido. O macerado foi submetido à infusão com água destilada fervente, até atingir a temperatura de ambiente (23°C). O extrato foi filtrado em papel de filtro (26 μm) e liofilizado durante 24 horas à temperatura de -10°C e 2,5 mbar de pressão, em liofilizador modelo Alpha 1-2 LD plus da Christ.

Os extratos foram ressuspensos em água ultra pura, injetados na concentração de 10 mgmL^{-1} em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-20 da Shimadzu, com amostrador automático (SIL-20 A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution 1.0. A coluna utilizada foi a C-18 (250 mm x 4 mm id, 5 μm) em combinação com pré-coluna C-18 (4 mm x 4 mm id, 5 μm) e o volume de injeção de 10 μL . As fases móveis utilizadas foram água ultrapura (A) e acetonitrila (B), cada uma contendo 0,01% de ácido fosfórico (v / v). O gradiente iniciou com 95% A, após 20 minutos 72% A, aos 30 minutos 5% A, aos 35 minutos a proporção utilizada foi de 95% A. O tempo total de análise foi de 35 minutos, com temperatura de 40°C e fluxo de injeção de 1,0 mLmin^{-1} .

Foram preparadas e injetadas 10 μL das soluções padrões de ácido chicórico (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$ de pureza, grau HPLC, 8 mgmL^{-1} em água ultrapura) e isoorientin (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$ de pureza, grau HPLC 0,5 mgmL^{-1} em metanol grau HPLC). Os cromatogramas das amostras e dos padrões foram obtidos em espectros de UV na faixa de 195 a 400 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software R (Team, 2017). A dissimilaridade química quanto ao perfil do extrato dos acessos de *E. floribundus* e *E. subalatus* foi calculada a partir do índice de Jaccard, para dados binários, levando em consideração os compostos que apresentaram espectro em UV-Visível característico de compostos fenólicos, a 210 nm. Esses foram alinhados em matriz binária de acordo com a sua ausência ou presença, com o auxílio do tempo de retenção, utilizada no cálculo da dissimilaridade. O dendrograma foi construído utilizando o método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Para obter informações sobre a eficiência do dendrograma, foi calculada a correlação cofenética. Para estabelecer o ponto de corte no dendrograma recorreu-se ao método de Mojena.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TRIAGEM FITOQUÍMICA, FLAVONOIDES E FENÓIS TOTAIS

Os extratos aquosos variaram sua coloração entre os acessos, de tons amarelo claro a amarronzado, enquanto o extrato hidro alcoólico apresentou coloração verde intensa. Foram observados resultados positivos para fenóis; flavonoides; flavonas, flavonóis e xantonas; esteroides e triterpenoides. Tanus-Rangel *et al.* (2010), ao estudarem atividade biológica do extrato das folhas de *Echinodorus*

macrophyllus, atribuíram o efeito anti-inflamatório à presença de triterpenos, esteroides, flavonas, xantonas e flavonoides no extrato. Os flavonoides também são alvos de estudo do extrato das folhas de *Echinodorus grandiflorus*, sendo estes responsáveis pela atividade anti-inflamatória e diurética (Garcia et al., 2016; Silva et al., 2016). Os demais grupos funcionais não foram possíveis de serem detectados pelos testes realizados.

Com relação ao conteúdo total de flavonoides e fenóis totais na literatura, as unidades de quantificação são variáveis desde $\mu\text{g mL}^{-1}$ até g/g de extrato, decorrentes da falta de padronização do método para as espécies do gênero *Echinodorus*. Pelo mesmo motivo são observadas variações nos padrões utilizados para quantificação. No que se refere à escolha do padrão de equivalência para quantificação de flavonoides totais, sabe-se que a vitexina é um dos flavonoides presente nas espécies *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, contudo, pouco disponível em mercado, sendo mais comuns de serem encontrados à venda os flavonoides quercetina e rutina, que possuem estruturas similares, diferenciando apenas no radical. Enquanto a quercetina apresenta uma hidroxila, a rutina possui uma glicose e uma ramnose (Afanas' Ev et al., 1989; Pedriali, 2005) (Figura 1). Por sua vez, na literatura, os fenóis em *Echinodorus* são calculados a partir da equivalência com padrões de ácido gálico, ácido tânico ou catequina (Tabela 1). O ácido tânico é um tanino hidrolisável, que é quebrado por enzimas em glicose e ácido gálico, que é um galotanino (Battestin; Matsuda; Macedo, 2004), já a catequina é um polifenol que pode apresentar ação antioxidante (Lamarão; Fialho, 2009) (Figura 1). Para fins de comparação, os resultados da literatura para flavonoides e fenóis totais foram convertidos em mg equivalentes de padrão/ g de folha (Tabela 1).

Quanto ao conteúdo total de flavonoides, em *E. floribundus* houve variação de 2,80 a 5,00 mg equivalentes de rutina/ g de folha e em *E. subalatus* a média de flavonoides totais foi de 3,50 mg equivalentes de rutina/ g de folha. Para a espécie *E. floribundus* foi possível observar variação de 0,4 a 5,3 mg equivalentes de ácido tânico/ g de folha no conteúdo total de fenóis, já para *E. subalatus*, a quantidade média de fenóis foi de 1,63 mg equivalentes de ácido tânico/ g de folha (Tabela 1). Esses valores foram menores do que os relatados pela literatura para as espécies *E. grandiflorus*, *E. macrophyllus* e *E. scaber* (Tabela1). As amostras comerciais obtiveram os menores valores de fenóis e flavonoides totais (Tabela1).

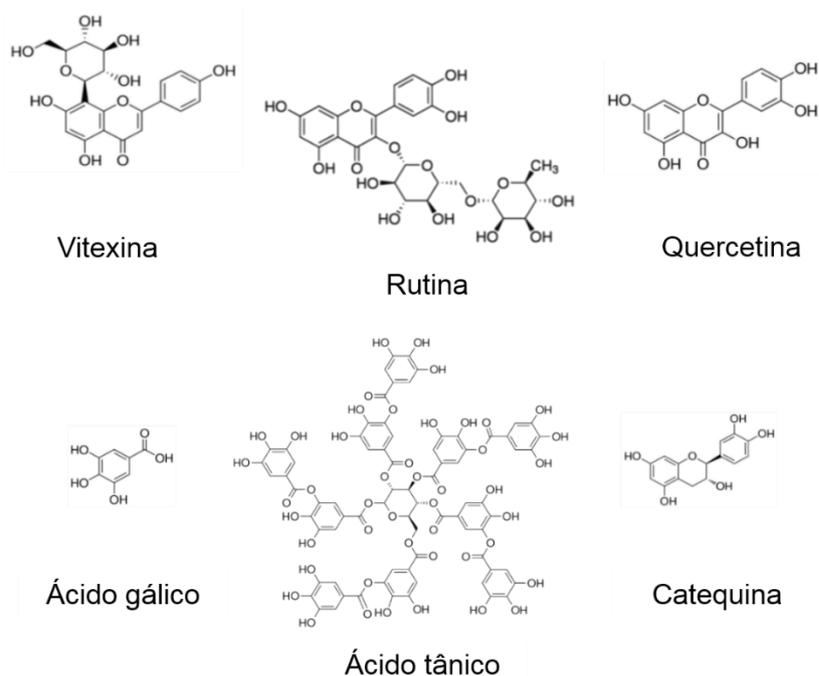


Figura 1 – Estruturas dos padrões utilizados na quantificação de flavonoides e fenóis totais em *Echinodorus sp*

Tabela 1 – Teor de flavonoides e fenóis totais em amostras de chapéu-de-couro (*Echinodorus sp.*)

Espécie	Flavonoides totais	Fenóis totais	Literatura
<i>E. floribundus</i>	2,80 a 5,00 mg equivalentes de rutina/ g de folha	0,40 a 5,30 mg equivalentes de ácido tânico/ g de folha	
<i>E. subalatus</i>	3,50 mg equivalentes de rutina/ g de folha	1,63 mg equivalentes de ácido tânico/ g de folha	
Amostra comercial	0,001 mg equivalentes de rutina/ g de folha	0,09 mg equivalentes de ácido tânico/ g de folha	
<i>E. grandiflorus</i>	8225 mg equivalentes de rutina/ g de folha	-	Garcia <i>et al.</i> (2010)
	98,13 a 363,75 mg equivalentes de vitexina/ g folha	7,08 mg equivalentes de catequina/ g de folha	Strada <i>et al.</i> (2017)
<i>E. macrophyllus</i>	2,90 mg equivalentes de quercetina/ g de folha	-	Flor <i>et al.</i> (2011)
	33,50 mg equivalente de quercetina/ g de folha	-	Silva <i>et al.</i> (2016)
<i>E. scaber</i>	197,78 mg equivalentes de rutina/ g de folha	222,20 mg equivalentes de ácido gálico/ g de folha	Rosa <i>et al.</i> (2017)
	7,50 a 584,38 mg equivalentes de vitexina/ g de folha	8,25 mg equivalentes de catequina/ g de folha	Strada <i>et al.</i> (2017)

PERFIL DO EXTRATO POR CLAE-DAD

Foram detectados 118 compostos nos acessos de *E. floribundus* e 121 compostos nos acessos de *E. subalatus*. Do total de compostos detectados nos acessos de *E. floribundus*, 113 compostos foram similares entre todos os acessos, dois foram encontrados em todos os acessos, exceto no acesso Itacambira (ITC) e três foram encontrados apenas no acesso Santana do Riacho (STR). Já para *E. subalatus*, 115 estão presentes em todos os acessos, um outro composto não foi detectado apenas no acesso MC2, três estão presentes apenas nos acessos Montes Claros 1 (MC1) e São João da Ponte (SJP) e dois compostos foram detectados apenas no acesso SJP. Porém, esses compostos não foram possíveis de serem identificados devido à falta de padrões. Dentre todos os compostos detectados nas duas espécies, 25 se destacaram por apresentarem espectro UV-Vis, característicos de compostos fenólicos, como flavonoides e ácido *o*-hidroxicinâmico (Figura 2 e 3). Desses, dois compostos, de número 2 e 24, se destacam pela ocorrência frequente nos acessos das duas espécies (Tabela 2), 15 compostos foram exclusivamente em acesso de *E. floribundus* (Tabela 2) e quatro compostos em acessos de *E. subalatus* (Tabela 2). Em nenhum dos acessos de *E. floribundus* e *E. subalatus* foi possível detectar o flavonoide isoorientin e o ácido chicórico, que são compostos descritos para as espécies *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*. Porém, a não detecção deste composto, ou do flavonoide isoorientin, nos extratos de *E. floribundus* e *E. subalatus* não descarta a possibilidade de essas espécies possuírem atividade biológica, uma vez que a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019) preconiza que a droga vegetal de chapéu-de-couro (*E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*) deve possuir o teor de 2,8% de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico, mas não menciona o ácido chicórico e o isoorientin como marcadores químicos específicos.

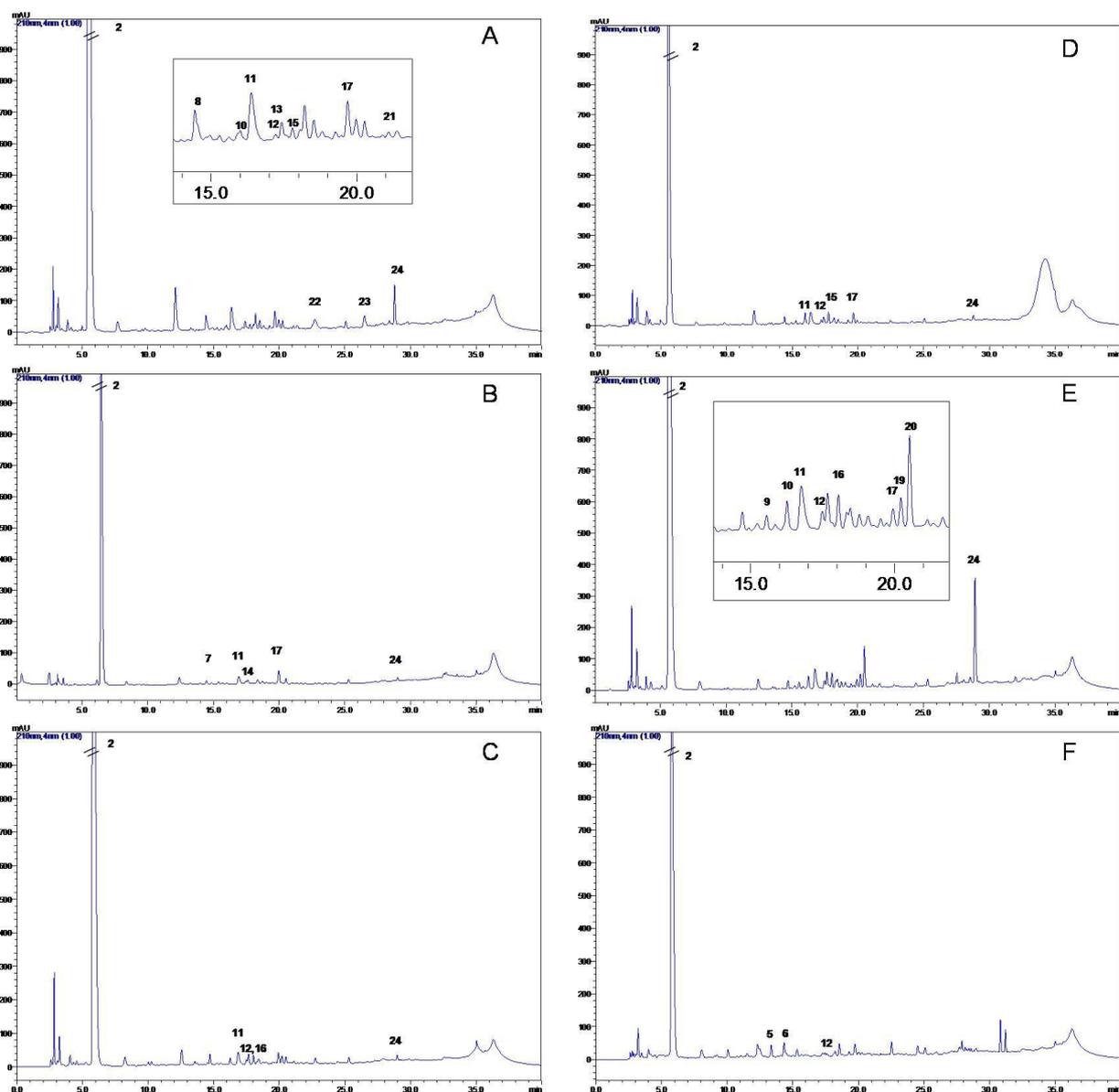


Figura 2 – Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas de *Echinodorus floribundus* (A-F) analisados por CLAE-DAD. (1-25) compostos que apresentam espectro UV-Vis característicos de fenólicos; (A) BTM: Botumirim; (B) CNM: Cônego Marinho; (C) CPL: Capelinha; (D) CTL: Cristália; (E) ITC: Itacambira; (F) SRT: Santana do Riacho

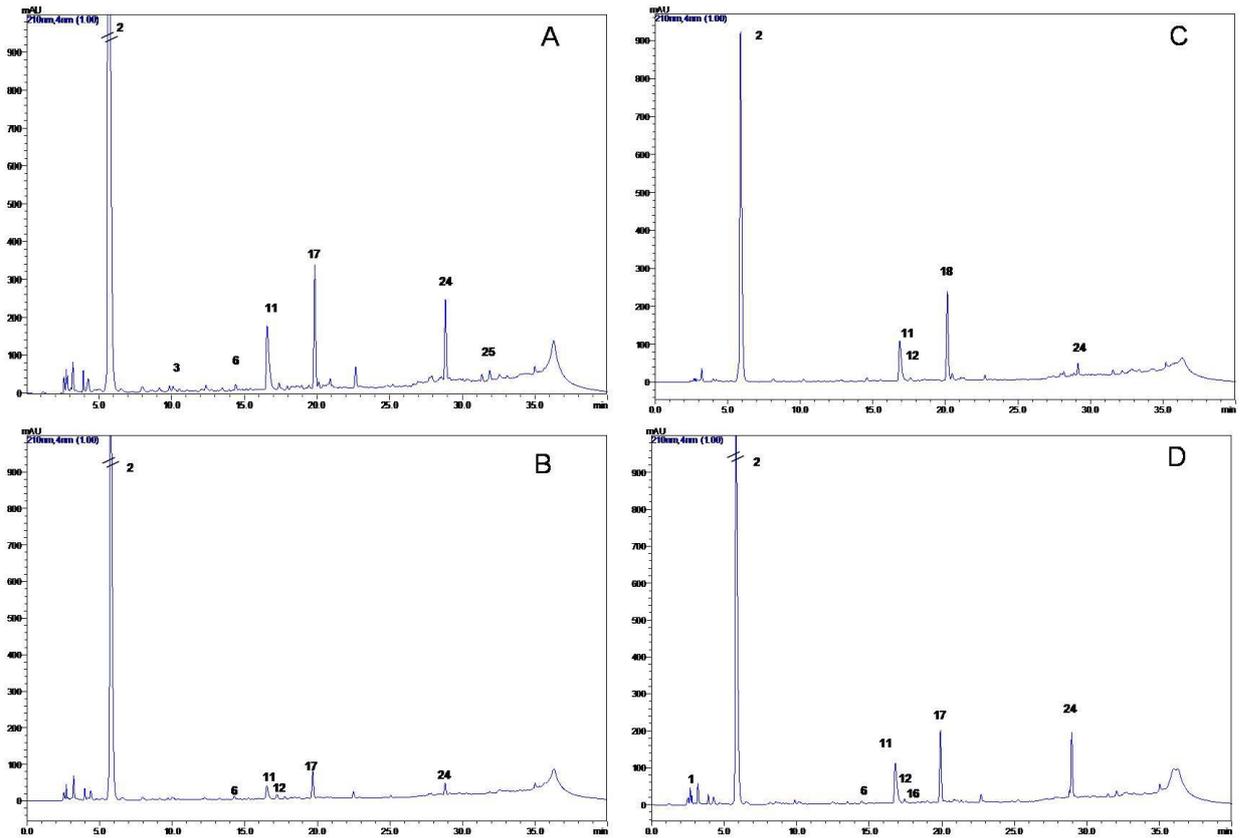


Figura 3 – Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas de *Echinodoros subalatus* (A-D) analisados por CLAE-DAD. (1-25) compostos que apresentam espectro UV-Vis característico de fenólicos; (A) MC1: Montes Claros; (B) MC2: Montes Claros; (C) MC4: Montes Claros; (D) SJP: São João da Ponte

Tabela 2 – Compostos detectados em HPLC em *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* com características de compostos fenólicos

Composto	Espécie	TR (min)	Λ (nm)
1	<i>E. subalatus</i> (SJP)	2.5	202; 212; 278; 361
2	<i>E. floribundus</i> (BTM, CNM, CPL, CTL, ITC, SDC), <i>E. subalatus</i> (MC1, MC2, MC4, SJP)	5.5 - 6.4	201; 202 ; 208; 211 ; 213 ; 214 ; 369 ; 372; 374
3	<i>E. subalatus</i> (MC1)	10.2	201; 270; 389
4	<i>E. floribundus</i> (BTM)	12.1	207; 325
5	<i>E. floribundus</i> (SDC)	13.3	220; 265
6	<i>E. floribundus</i> (SDC), <i>E. subalatus</i> (MC1, MC2, SJP)	14.0 - 14.4	204 ; 205; 217; 218 ; 219; 260 ; 261 ; 290 ; 291
7	<i>E. floribundus</i> (CNM)	14.8	217; 238; 322
8	<i>E. floribundus</i> (BTM)	14.9	201; 231; 313
9	<i>E. floribundus</i> (SDC)	15.2	200; 230; 311
10	<i>E. floribundus</i> (BTM, ITC)	15.9 - 16.2	201 ; 215; 216; 271 ; 331; 336
11	<i>E. floribundus</i> (BTM, CNM, CPL, CTL, ITC), <i>E. subalatus</i> (MC1, MC2, MC4, SJP)	16.1 - 16.9	198; 218; 219 ; 236 ; 327 ; 328
12	<i>E. floribundus</i> (BTM, CPL, CTL, ITC, SDC), <i>E. subalatus</i> (MC2, MC4, SJP)	16.5 - 17.5	204 ; 229; 230 ; 279 ; 280; 309 ; 310
13	<i>E. floribundus</i> (BTM)	17.4	204; 270; 331
14	<i>E. floribundus</i> (CNM)	17.5	231; 280; 308
15	<i>E. floribundus</i> (BTM, CTL)	17.7- 17.8	201 ; 215; 216; 271 ; 331; 336
16	<i>E. floribundus</i> (CPL, ITC)	18.0	(201; 216 ; 271 ; 334; 336)
17	<i>E. floribundus</i> (BTM, CNM, CPL, CTL, ITC, SDC)	19.6 - 19.9	198; 200 ; 218 ; 232; 236; 296; 322
18	<i>E. subalatus</i> (MC4)	20.1	218; 235; 322
19	<i>E. floribundus</i> (ITC)	20.2	200; 214; 270; 336
20	<i>E. floribundus</i> (ITC)	20.5	199; 214; 270; 337
21	<i>E. floribundus</i> (BTM)	21.3	201; 327
22	<i>E. floribundus</i> (BTM)	22.7	198; 218; 235; 330
23	<i>E. floribundus</i> (BTM)	26.5	218; 236; 328
24	<i>E. floribundus</i> (BTM, CNM, CPL, CTL, ITC), <i>E. subalatus</i> (MC1, MC2, MC4, SJP)	28.7 - 29.1	217 ; 219 ; 235 ; 236 ; 237; 238 ; 329
25	<i>E. subalatus</i> (MC1)	31.8	235; 329

TR: tempo de retenção; Λ : bandas de absorção no UV-Vis. Números em negrito correspondem às bandas de absorção comuns entre os acessos. CNM: Cônego Marinho; CPL: Capelinha; CTL: Cristália; ITC: Itacambira; MC1: Montes Claros; MC2: Montes Claros; MC4: Montes Claros; SJP: São João da Ponte; SRT: Santana do Riacho.

DERIVADOS DO ÁCIDO O-HIDROXICINÂMICO

O teor de derivados do ácido hidroxicinâmico da amostra comercial inferior à quantidade mínima recomendada pela Farmacopeia Brasileira (Tabela 3), é de 2,8% de derivados do ácido hidroxicinâmico, expressos em verbacosídeos (Brasil, 2019). Já as espécies *E. subalatus* e *E. floribundus* apresentaram valores superiores ao determinado pela Farmacopeia Brasileira, contendo 3,07% e 5,52% de derivados do ácido hidroxicinâmico, expressos em verbacosídeos, respectivamente (Tabela 3). O teor de derivados do ácido hidroxicinâmico em *E. subalatus* é análogo aos valores descritos para a espécie *E. grandiflorus* por Lopes *et al.* (2012) e Dias *et al.* (2013). Já o teor de derivados do ácido hidroxicinâmico em *E. floribundus* é superior aos teores descritos em literatura para a espécie *E. grandiflorus* (Tabela 3). Esses resultados são indícios de que as espécies estudadas no presente trabalho também podem apresentar propriedades medicinais semelhantes às de *E. grandiflorus*. Isso porque, embora não haja estudos publicados que confirmem, as espécies de *Echinodorus* ecologicamente congêneres aparentam possuir respostas semelhantes (Lehtonen, 2007), justificando, em parte, o uso popular das espécies do presente estudo

Tabela 3 - Determinação do teor de derivados do ácido hidroxicinâmico em amostras de chapéu-de-couro (*Echinodorus* sp.)

Espécie	Teor médio de derivados do ácido hidroxicinâmico	
<i>E. floribundus</i>	5,52	
<i>E. subalatus</i>	3,07	
Amostra comercial	0,51	
		Literatura
<i>E. grandiflorus</i>	3,12 – 3,73	Lopes <i>et al.</i> (2012)
	2,10 – 3,89	Dias <i>et al.</i> (2013)

Por meio dos resultados obtidos, é possível concluir que as espécies *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* possuem concentrações de flavonoides e fenóis inferiores às espécies estudadas na literatura e ausentes de ácido chicórico e isoorientin. Entretanto, há similaridade química entre as espécies estudadas com as espécies descritas pela Farmacopeia Brasileira, as quais apresentam teores de derivados do ácido hidroxicinâmico superiores ao que é exigido. Este resultado fornece evidências científicas relevantes para apoiar o uso tradicional das espécies *E. floribundus* e *E. subalatus*.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À FAPEMIG e pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. [?] ed. San Diego, Califórnia: Academic press, 2012. 302 p.
- AFANAS' EV, I. B. *et al.* Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.
- AMORIM, E. L. C. *et al.* A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. **Mate Couro**. Disponível em: <<https://abir.org.br/associado/mate-couro/>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- BAPTISTA, L. B. M. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos fitoterápicos produzidos na Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante - ES**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2012.
- BARBOSA, U. A. *et al.* Determination and Evaluation of the Metals and Metalloids in the Chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli). **Biological trace element research**, v. 154, n. 3, p. 412-417, 2013.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.
- BOLSON, M. *et al.* Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, Volume 2. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, Volume II – Monografias: Plantas Medicinais. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 739 p.
- BRUNEL, S. Pathway analysis: aquatic plants imported in 10 EPPO countries. **EPPO bulletin**, v. 39, n. 2, p. 201-213, 2009.
- CARDOSO, F. F. **Estudos estruturais e funcionais da interação entre derivados do ácido cinâmico e fosfolipase A2 homóloga do veneno de *Bothrops jararacussu***. 2016. 57 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de

Biociências de Botucatu, Botucatu, São Paulo, 2016.

CARVALHO, A. T. **Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores**. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CARVALHO, A. T.; SCHLINDWEIN, C. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 2, p. 355-368, 2011.

COELHO, M. G. P. *et al.* Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, p. 245-251, 2013.

D-ARCHIVIO, M. *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DIAS, E. G. E. *et al.* Qualidade e autenticidade de folhas de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) oriundas de fornecedores de São Paulo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 250-256, 2013.

FLOR, R. V. *et al.* Drying of *Echinodorus macrophyllus* and autoclaving and lyophilization of the fluid-extract: effects on the pharmacochemical composition. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 518-524, 2011.

GARCIA, E. F. *et al.* Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

GARCIA, E. F. *et al.* Effect of the hydroethanolic extract from *Echinodorus grandiflorus* leaves and a fraction enriched in flavone-C-glycosides on antigen-induced arthritis in mice. **Planta Medica**, v. 82, n. 05, p. 407-413, 2016.

GARCIA, E. F. *et al.* In vitro TNF- α inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. **Planta Medica**, v. 82, n. 04, p. 337-343, 2016.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p. 495-500, 1995.

HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In: DEY, M. P.; HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry**, 1. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press. 1989. v. 1, p. 1-28.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. Notes on *Echinodorus* (Alismataceae). **Brittonia**, v. 38, n. 4, p. 325-332, 1986.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. The Alismataceae. **Flora Neotropica**, p. 1-112, 1994.

KARERU, P. G. *et al.* Direct detection of triterpenoid saponins in medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, n. 1, p. 56-60, 2008.

KOBAYASHI, J. *et al.* Echinophyllins C- F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 11, p. 1576-1579, 2000.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de nutrição**, 2009.

LEHTONEN, S. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. **Kew Bulletin**, v. 63, n. 4, p. 525-563, 2008.

LEHTONEN, S. Phylogenetics of *Echinodorus* (Alismataceae) based on morphological data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 150, n. 3, p. 291-305, 2006.

LEHTONEN, S. **Natural History of Echinodorus (Alismataceae)**. Turku: Turun Yliopisto, 2007. 58 p.

LEHTONEN, S.; MYLLYS, L. Cladistic analysis of *Echinodorus* (Alismataceae): simultaneous analysis of molecular and morphological data. **Cladistics**, v. 24, n. 2, p. 218-239, 2008.

LIMA-DELLAMORA, E. C. *et al.* Genotoxic Maillard byproducts in current phytopharmaceutical preparations of *Echinodorus grandiflorus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1385-1394, 2014.

LOPES, G. C. *et al.* Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido o-hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 500-505, 2012.

LOPES, O. D. *et al.* Determinação do coeficiente de cultura (Kc) e eficiência do uso de água do alecrim-pimenta irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 15, n. 6, 2011.

LUNARDI, R. F. *et al.* In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, "leather hat," in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1451-1462, 2014.

MATIAS, L. Q. *et al.* Morphology and micromorphology of the seed coats of species of *Echinodorus* (Alismataceae) from Brazilian Northeastern. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais**, v. 4, n. 2, p. 165-173, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MONTEIRO, A. D. P. **Produção de cervejas especiais adicionadas de extratos solúveis de ervas nativas com propriedades antioxidantes**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MORO, M. F.; DE SOUSA, D. J. L.; MATIAS, L. Q. Rarefaction, richness estimation and extrapolation methods in the evaluation of unseen plant diversity in aquatic ecosystems. **Aquatic Botany**, v. 117, p. 48-55, 2014.

OLIVEIRA, A.; BOVE, C. Checklist of aquatic and marshy Monocotyledons from the Araguaia River basin, Brazilian Cerrado. **Biodiversity Data Journal**, n. 4, 2016.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutico). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 623-628, 2006.

PIXOTO SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PORTELLA, V. G. *et al.* Nephroprotective effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Nephron Extra**, v. 2, n. 1, p. 177-183, 2012.

PRANDO, T. B. L. *et al.* Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249-1258, 2016.

RATAJ, K. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. et Schlecht.) Mich., its geographical distribution and variability. **Folia Geobotanica & Phytotaxonomica**, v. 4, n. 3, p. 319-326, 1969.

RIBEIRO, E. S. *et al.* Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 6, p. 605-612, 2015.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends In Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotechnologia**,

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 445-450, 2010.

SILVA, F. A.; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (urucum). **Holos**, v. 2, p. 484-498, 2018.

SILVA, G. P. *et al.* Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1584-1596, 2016.

SILVA, T. M. *et al.* Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to γ -radiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 600-607, 2013.

SILVA, T. M. *et al.* Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 22-26, 2012.

STRADA, C. L. *et al.* Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 619-626, 2017.

TABOSA, A. B.; MATIAS, L. Q.; MARTINS, F. R. Live fast and die young: the aquatic macrophyte dynamics in a temporary pool in the Brazilian semiarid region. **Aquatic Botany**, v. 102, p. 71-78, 2012.

TANUS-RANGEL, E. *et al.* Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1161-1166, 2010.

TEAM, R. Core. R Core Team (2017). **R: A language and environment for statistical computing**. R Found. Stat. Comput. Vienna, Áustria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

WAN-RU, L. *et al.* Effect of organic acids amendment on cadmium uptake and translocation by *Echinodorus osiris*. **Chin J Soil Sci**, v. 45, n. 1, p. 205-209, 2014.

YING, L. *et al.* A comparison of the decontaminating effects of hydroponic plants on domestic sewage. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, v. 36, n. 4, p. 881-886, 2014.

5. CONCLUSÕES/ CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que há similaridade química e fenológica das espécies estudadas, *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus*, com as descritas na literatura, *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*. Contudo, ocorrem variações interespecíficas no perfil químico de voláteis e em alguns descritores morfológicos, sendo recomendada a utilização apenas dos descritores limbo foliar, ápice e base do limbo foliar, pilosidade foliar e pilosidade do pecíolo foliar para diferenciação entre as duas espécies.

Também, pode-se afirmar que as espécies *Echinodorus floribundus* e *Echinodorus subalatus* apresentam conteúdo total de flavonoides e fenóis em menores concentrações do que as espécies de *Echinodorus* descritas na literatura. Por fim, há similaridade das espécies estudadas com as descritas pela Farmacopeia Brasileira, com potencial uso medicinal.