

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS FREDERICO WESTPHALEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: AGRICULTURA
E AMBIENTE

Leonardo Antonio Thiesen

**DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE SOBRE A
FITOMASSA, ANATOMIA FOLIAR E PRODUÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE CIDRÓ**

Frederico Westphalen, RS
2019

Leonardo Antonio Thiesen

**DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE SOBRE A FITOMASSA,
ANATOMIA FOLIAR E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CIDRÓ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Schmidt

Frederico Westphalen, RS
2019

Thiesen, Leonardo Antonio

Disponibilidade hídrica e sazonalidade sobre a fitomassa, anatomia foliar e produção de óleo essencial de cidrô / Leonardo Antonio Thiesen.- 2019.

97 p.; 30 cm

Orientadora: Denise Schmidt

Coorientador: Braulio Otomar Caron

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2019

1. Aloysia triphylla 2. Estresse hídrico 3. Crescimento 4. Metabólitos secundários I. Schmidt, Denise II. Caron, Braulio Otomar III. Título.

Leonardo Antonio Thiesen

**DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE SOBRE A FITOMASSA,
ANATOMIA FOLIAR E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CIDRÓ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2019:



Denise Schmidt, Dra. (UFSM)
(Orientadora)



Alexandre Behling, Dr. (UFPR)



Sandro Luis Petter Medeiros, Dr. (UFSM)

Frederico Westphalen, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, principalmente aos meus pais Clóvis e Lorette Thiesen e ao meu irmão Luis Otávio Thiesen, minha namorada, colegas e amigos, que sempre incentivaram, apoiaram e acreditaram em meus ideais.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- à Deus, pela vida e pelas oportunidades que tem posto em meu caminho e pela onipresença durante todos esses anos vividos.

- aos meus pais Clóvis Antonio Thiesen e Lorette Thiesen, assim como meu irmão Luis Otávio Thiesen e namorada Daiana Fernanda Hilgemann, pelo incentivo, pelo apoio às minhas decisões e pela confiança depositada para que eu pudesse chegar até aqui.

- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* Frederico Westphalen e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente (PPGAAA) pela oportunidade de mestrado e pelo acesso a Pós-graduação pública, gratuita e de qualidade. Em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante esse período.

- à professora Dra. Denise Schmidt pela confiança, apoio e orientações a mim dispensadas durante todo esse período, ao professor co-orientador Dr. Braúlio Otomar Caron e aos professores Drs. Elder Eloy e Marcos Vinícius Marques Pinheiro pela parceria.

- aos amigos e colegas de laboratório e de trabalho Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Bruna Stringari Altíssimo, Ezequiel Holz, Evandro Holz, Anderson Werner, Carine Cocco, Edileize Holz, Carla Stringari Altissimo, Guilherme Massaro Araújo, Anderson Rafael Webler, Fábio Miguel Knapp, Daiane Prochnow, Gabrieli Cristina Vitalli de Azevedo, João Antonio de Cristo, Iuri Naibo, Axel Mariotto, Daniele Cristina Fontana, Alana Schmidt, Marcela Zanatta, Matheus Milani e demais integrantes pela amizade, companheirismo, conhecimento e pelo auxílio na condução deste trabalho.

Enfim, a todos que fazem parte da minha vida, que torceram por mim e deram sua contribuição nesta jornada, meu MUITO OBRIGADO!

*Escolha um trabalho que você ame e você
nunca terá que trabalhar um dia em sua vida.*

(Confúcio)

RESUMO

DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE SOBRE A FITOMASSA, ANATOMIA FOLIAR E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CIDRÓ

AUTOR: Leonardo Antonio Thiesen
ORIENTADORA: Denise Schmidt

A sazonalidade e a disponibilidade hídrica são fatores ambientais que influenciam diretamente sobre o crescimento, desenvolvimento e produção de metabólitos secundários em plantas aromáticas. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar a produção de fitomassa, pigmentos fotossintéticos, densidade estomática e de tricomas, rendimento, teor e caracterização da composição química do óleo essencial de plantas de *Aloysia triphylla* em resposta à diferentes disponibilidades hídricas e sazonalidade. A pesquisa foi desenvolvida no período de 2015 e 2017, em ambiente protegido, na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, composto por quatro níveis de disponibilidade hídrica, sendo 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo durante as estações do ano do outono, inverno, primavera e verão. O controle da disponibilidade hídrica foi realizado por meio da pesagem diária dos vasos, sendo que as irrigações com diferentes disponibilidades hídricas foram iniciadas na metade de cada estação. Foram avaliados ao final de cada estação: altura de plantas, fitomassa (massa fresca e seca de ramos, massa fresca e seca de folhas e área foliar), pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides), densidade estomática e de tricomas glandulares, rendimento, teor e caracterização da composição química do óleo essencial. Observou-se que a fitomassa foi significativamente superior durante o cultivo na primavera e com maiores disponibilidades hídricas, enquanto que as estações de outono e inverno, assim como as menores disponibilidades hídricas afetaram negativamente o crescimento das plantas. Os maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos e densidade estomática também foram superiores na estação de primavera. As maiores densidades de tricomas glandulares foram encontradas na porção abaxial das folhas durante o inverno e verão. Além disso, observou-se maior rendimento do óleo essencial na estação da primavera com maiores disponibilidades hídricas, seguida pelo verão, enquanto que maior teor foi observado durante o inverno com baixas disponibilidades hídricas. A caracterização química do óleo essencial possibilitou identificar maior quantidade de componentes no verão. No entanto, maior concentração dos componentes majoritários foram obtidas com baixa disponibilidade hídrica no inverno. Conclui-se que na primavera ocorre maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos e maior densidade estomática, indicando melhores respostas pelas plantas. Além disso, a estação da primavera com maior disponibilidade hídrica é indicada para maior produção de fitomassa e rendimento do óleo essencial. A densidade de tricomas glandulares aumentam nas estações de inverno e verão. O aumento no teor e concentração dos componentes majoritários α -citral e β -citral ocorrem no inverno sob baixas disponibilidades hídricas. No cultivo de verão ocorre maior quantidade de componentes químicos, sendo que menor disponibilidade hídrica reduz a concentração dos componentes α -citral e β -citral, aumentando significativamente a concentração de óxido de cariofileno.

Palavras-chave: *Aloysia triphylla*. Estresse hídrico. Crescimento. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

HYDRICAL AVAILABILITY AND SEASONALITY ON PHYTOMASS, FOLIAR ANATOMY AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF CIDRÓ

AUTHOR: Leonardo Antonio Thiesen

ADVISOR: Denise Schmidt

Seasonality and water availability are environmental factors that directly influence the growth, development and production of secondary metabolites in aromatic plants. The objective of the study was to evaluate phytomass production, photosynthetic pigments, stomatal and trichome density, yield, content and characterization of the essential oil composition of *Aloysia triphylla* plants in response to different water availability and seasonality. The research was developed in the period of 2015 and 2017, in protected environment in the experimental area of the Federal University of Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen. The experimental design was a randomized complete block design in a 4x4 factorial scheme, consisting of four levels of water availability: 25%, 50%, 75% and 100% of field capacity during the autumn, winter, spring and summer seasons. The water availability control was carried out by means of the daily weighing of the pots, and the irrigations with different water availability were started in the middle of each season. They were evaluated at the end of each season: plant height, phytomass (fresh and dry mass of branches, fresh and dry leaf mass and leaf area), photosynthetic pigments (Chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids), stomatal density and glandular trichomes, yield, content and characterization of the chemical composition of the essential oil. It was observed that phytomass was significantly higher during spring cultivation and with higher water availability, while autumn and winter seasons, as well as lower water availability, negatively affected plant growth. The highest content of photosynthetic pigments and stomatal density were also higher in the spring season. The highest densities of glandular trichomes were found in the abaxial portion of the leaves during winter and summer. In addition, higher yields of essential oil were observed in the spring season with higher water availability, followed by summer, while higher content was observed during the winter with low water availability. The chemical characterization of the essential oil made it possible to identify more components in the summer. However, higher concentrations of the major components were obtained with low water availability in the winter. It is concluded that in spring there is a higher content of photosynthetic pigments and higher stomatal density, indicating better responses by plants. In addition, the spring season with higher water availability is indicated for higher phytomass production and yield of essential oil. The density of glandular trichomes increases in the winter and summer seasons. The increase in the content and concentration of the major components α -citral and β -citral occur in winter under low water availability. In the summer crop, a greater quantity of chemical components occurs, and less water availability reduces the concentration of α -citral and β -citral components, significantly increasing the concentration of caryophyllene oxide.

Keywords: *Aloysia triphylla*. Hydric stress. Growth. Secondary metabolites.

LISTA DE TABELA

ARTIGO 3

Tabela 1 - Porcentagem dos componentes químicos do óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> submetidos a diferentes disponibilidades hídricas durante as estações de inverno, primavera e verão.	78
---	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Temperatura do ar máxima, mínima e média registradas no interior do ambiente protegido nas estações de outono (A), inverno (B) e primavera (C) de 2016 e verão (D) 2016/2017, durante o período de condução de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas..... 29
- Figura 2 - Altura de plantas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas, durante as quatro estações do ano 30
- Figura 3 - Massa fresca de ramos de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as quatro estações do ano. 31
- Figura 4 - Massa seca de ramos de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as as quatro estações do ano..... 32
- Figura 5 - Massa fresca de folhas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as quatro estações do ano 33
- Figura 6 - Massa seca de folhas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as quatro estações do ano 34
- Figura 7 - Área foliar de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as quatro estações do ano 35
- Figura 8 - Conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides (Carot), clorofila total (Chl total), razão clorofila *a/b* (Razão *a/b*) e razão clorofila total/carotenoides (Total/carot) de *Aloysia triphylla* significativos para o fator sazonalidade (A) e clorofila *a*, carotenoides e clorofila total significativos para o fator disponibilidade hídrica (B). 36

ARTIGO 2

- Figura 1 - Detalhes dos estômatos e tricomas da epiderme adaxial (a) e abaxial (b) de folhas de *Aloysia triphylla* a partir de microscopia eletrônica de varredura 56
- Figura 2 - Densidade estomática da epiderme abaxial de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo em diferentes estações do ano 57
- Figura 3 - Comprimento e largura dos estômatos de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo em diferentes estações do ano 58
- Figura 4 - Área estomática de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo em diferentes estações do ano 60
- Figura 5 - Densidade de tricomas glandulares da epiderme abaxial (a) e adaxial (b) de folhas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as estações do ano 62

ARTIGO 3

- Figura 1 - Teor de óleo essencial (%) de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes condições de disponibilidade hídrica e sazonalidade..... 76
- Figura 2 - Rendimento de óleo essencial (kg ha⁻¹) de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes condições de disponibilidade hídrica e sazonalidade..... 76
- Figura 3 - *Heatmap* dos componentes químicos do óleo essencial de *Aloysia triphylla* submetidos a diferentes disponibilidades hídricas durante as estações de inverno, primavera e verão..... 80
- Figura 4 - *Score plot* (A) e *loading plot* (B) da análise de componentes principais derivados da análise metabolômica não direcionada dos componentes de óleo essencial obtidos em diferentes disponibilidades hídricas durante o inverno, primavera e verão 81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ORIGEM E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE	15
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	16
2.3 ESTRESSE HÍDRICO	17
2.4 SAZONALIDADE	18
3 ARTIGO 1 – DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE AFETAM A FITOMASSA E PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS DE <i>Aloysia triphylla</i>	20
3.1 RESUMO	21
3.2 ABSTRACT	22
3.3 INTRODUÇÃO	23
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.4.1 Condições de cultivo e propagação da espécie	24
3.4.2 Condições experimentais e variáveis de crescimento	25
3.4.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos	27
3.4.4 Análise estatística	28
3.5 RESULTADOS	28
3.6 DISCUSSÃO	36
3.7 REFERÊNCIAS	43
4 ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO ESTOMÁTICA E DE TRICOMAS GLANDULARES DE <i>Aloysia triphylla</i> SUBMETIDAS À CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO E VARIAÇÃO SAZONAL	48
4.1 RESUMO	49
4.2 ABSTRACT	50
4.3 INTRODUÇÃO	51
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.6 CONCLUSÃO	63
4.7 REFERÊNCIAS	64
5 ARTIGO 3 – RENDIMENTO, TEOR E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> EM FUNÇÃO DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE	68
5.1 RESUMO	69
5.2 ABSTRACT	69
5.3 INTRODUÇÃO	70
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	72
5.5 RESULTADOS	75
5.6 DISCUSSÃO	82
5.7 REFERÊNCIAS	88
6 DISCUSSÃO GERAL	92
7 CONCLUSÃO GERAL	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas vêm despertando interesse da indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo assim cada vez mais estudadas pelos pesquisadores. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos, são derivados de plantas (CALIXTO & SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Além da indústria farmacêutica, as plantas aromáticas também são utilizadas na indústria de cosméticos e na indústria química, aumentando a produção de plantas aromáticas e também de óleo essencial (SANGWAN; SANGWAN; KUMAR, 2001).

A *Aloysia triphylla* (Verbenaceae) é originária da Argentina e do Chile e foi descoberta no século XVIII pelos botânicos espanhóis (PARODI, 2010). A espécie é conhecida popularmente por cidró, cidrão, erva-luisa e limonete, tratando-se de planta que apresenta grande importância, em função das folhas conter diversos componentes químicos que apresentam diversas aplicações (PAULUS et al., 2013). As folhas e flores de *Aloysia triphylla* possuem propriedades aromáticas e armazenam o óleo essencial, sendo que este possui diversas propriedades medicinais, atuando em atividades anestésicas, antioxidantes (PARODI et al. 2012; BECKER et al., 2017), antiespasmódica, estimulante (PAULUS et al., 2013), antimicrobianas (SOUZA et al. 2017), e são comumente utilizados na medicina popular para combate da ansiedade, insônia, resfriados, como analgésico e sedativo e ainda como tempero de alimentos (OLIVA et al., 2010; VALENTÃO et al., 2002; ZEPPEFELD et al., 2014).

O óleo essencial da *Aloysia triphylla* é bastante volátil, sendo que o componente químico de maior interesse é o citral, substância que confere grande importância para indústrias farmacêuticas e de cosméticos (ROJAS; PALACIOS; RONCEROS, 2012). Porém, a espécie é promissora também para indústrias de químicos agrícolas, já que possui comprovadas propriedades antifúngica, inseticida e repelente (HABER & CLEMENTE, 2013). Além disso, o teor de óleo essencial normalmente aumenta em resposta às condições de estresse. Com isso, torna-se fundamental conhecer o crescimento, desenvolvimento e fisiologia das plantas diante de distintas condições ambientais para proporcionar maior fitomassa e rendimento de óleo essencial para indústria.

No entanto, as distintas condições meteorológicas que ocorrem ao longo do ano exercem influência direta sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas medicinais e aromáticas, assim como sobre a produção de metabólitos secundários (SCHWERZ et al., 2015). Em função disso, o efeito da sazonalidade pode afetar tanto as variáveis de crescimento da espécie, como

também o teor dos componentes químicos produzidos. Portanto, a época de maior produção de fitomassa pode não coincidir com a de maior teor de óleo essencial (BRANT et al., 2009).

A disponibilidade hídrica é um fator ambiental que exerce forte impacto sobre a produção agrícola, sendo que o estresse hídrico pode afetar os processos metabólicos das plantas, promovendo fechamento estomático, redução de crescimento, acúmulo de solutos e antioxidantes, rendimento de princípios ativos por unidade de área, entre outros (MEIRA et al., 2013). Além disso, as modificações das condições ambientais em função do efeito da sazonalidade e da disponibilidade hídrica, podem resultar em alterações nos tecidos foliares, como forma de tolerância aos fatores resultantes de estresse abiótico (BATISTA et al., 2010). No entanto, Alvarenga et al. (2012) aponta a necessidade de compreender melhor a resposta de plantas medicinais diante de condições estressantes como a disponibilidade hídrica, visto que o interesse comercial de *Aloysia triphylla* está relacionada a produção de compostos químicos do metabolismo secundário. Diante desses fatores, criou-se como hipóteses:

A produção de fitomassa de *Aloysia triphylla* é afetada em função da disponibilidade hídrica e da sazonalidade;

O maior crescimento e produção de fitomassa ocorrem nas estações com temperaturas mais elevadas;

Os pigmentos fotossintéticos sofrem variações em função da disponibilidade hídrica e sazonalidade e estão relacionados com as respostas produtivas das plantas;

A densidade estomática e de tricomas glandulares sofrem alterações a partir de diferentes disponibilidades hídrica e da variação sazonal;

O teor de óleo essencial será maior no cultivo em baixa disponibilidade hídrica e temperatura;

A maior produção de fitomassa resulta em maior rendimento de óleo essencial;

A composição do óleo essencial será afetada pela disponibilidade hídrica e sazonalidade.

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fitomassa, pigmentos fotossintéticos, densidade estomática e de tricomas glandulares, rendimento, teor e caracterização da composição química do óleo essencial de plantas de *Aloysia triphylla* em resposta à diferentes disponibilidades hídricas e à sazonalidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ORIGEM E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE

A *Aloysia triphylla* é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, nativa da região geográfica da Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile e sul do Brasil e possui uma grande variabilidade de nomes populares, sendo os mais comuns: cidró, limonete, doce-limão, cidrão e erva-luisa (GATTUSO et al., 2008). As propriedades medicinais e aromáticas da espécie envolvem atividades antibacterianas, sedativas, antioxidantes, anestésicas, anti-estressantes e até mesmo como promotores de crescimento, que já foram comprovadas em estudos com diversos animais aquáticos (PARODI et al., 2012; PARODI et al., 2013; PARODI et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2016; ZEPPENFELD et al., 2017).

A espécie possui porte arbustivo e pode atingir entre 1,50 e 2,50 metros de altura, com preferência por solos permeáveis, pH entre 6,5 e 7,2 e sem excesso de água. A espécie apresenta melhor adaptação em clima subtropical ao temperado, sendo que frio rigoroso tende a ocasionar perda das folhas e condições de baixa iluminação e/ou vento excessivo afetam o rendimento de óleo essencial e a produção dos ingredientes ativos (HERBOTECNIA, 2018). Geralmente, o maior crescimento vegetativo ocorre em meados de outubro, atingindo máximo de crescimento em meados do verão, quando se inicia a diferenciação floral (BRANT et al., 2008).

As folhas da *Aloysia triphylla* são simples, verticiladas com três à quatro folhas no mesmo nó, ligeiramente dentadas, coloração verde claro, venação peninérvea e quando esmagadas liberam um cheiro doce e agradável (HERBOTECNIA, 2018). Em corte transversal, as folhas apresentam cutícula fina, epiderme simples, mesófilo com parênquima paliçádico (2-3 camadas de células) e parênquima lacunoso ou esponjoso, com células irregulares. Ainda, os estômatos são anomocíticos e hipoestomáticos (CALZADA-SÁNCHEZ et al., 2014).

O óleo essencial geralmente é armazenado em tricomas glandulares presentes nas folhas das plantas, sendo que em *Aloysia citriodora*, considerada sinonímia de *Aloysia triphylla*, existe tricomas nas duas faces da folha, mas com maior quantidade na face abaxial, entretanto apresentam tamanho reduzido (GATTUSO et al., 2008). O óleo essencial da *Aloysia* apresenta como componente majoritário o citral (α -citral e β -citral) que podem representar mais de 50% da concentração dos constituintes químicos do óleo essencial, mas também apresentam constituintes como limoneno, óxido de cariofileno, 6-metil-5-hepten-2-ona, β -pineno, linalol, geraniol, cariofileno, entre outros que estão presentes em menores concentrações (PROCHNOW et al., 2017).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

De acordo com a Comtrade (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*), os maiores consumidores mundiais de óleo essencial são os Estados Unidos (40%), União Européia (30%), sendo a França e o Japão os países líderes em importações, assim movimentando no mercado mundial aproximadamente US\$ 15 bilhões por ano. O Brasil destaca-se entre os quatro maiores produtores mundiais de óleo essencial, juntamente com a Índia, China e Indonésia, estando nessa posição basicamente em função da produção de óleos essenciais cítricos. Existe cerca de 300 óleos essenciais de interesse comercial no mundo, sendo que o Brasil lidera a produção de óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) e de lima destilada (*Citrus aurantifolia*), entre os mais importantes (BIZZO, 2013).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis que podem ser extraídas de caule, folhas, raízes, flores e frutos das plantas (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018). Esses óleos são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, produzidos através do metabolismo secundário das plantas e utilizados para os mais diversos fins, como em cosméticos, perfumaria, alimentos e também em medicamentos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). As plantas aromáticas, produtoras de óleo essencial, são muito utilizadas na indústria farmacêutica, sendo que cerca de 30% dos medicamentos de terapêutica são derivados dessas plantas (CALIXTO & SIQUEIRA JR, 2008). Os óleos essenciais são empregados também como aromas, fixadores de fragrâncias, entre outros, fornecendo substâncias como limoneno, citral, citroneral, ergenol e mentol (SANTOS et al., 2006). Além disso, as plantas aromáticas são importantes para as indústrias de cosméticos e também química, aumentando a utilização do óleo essencial e criando a necessidade de aumentar o rendimento desses metabólitos secundários (SANGWAN; SANGWAN; KUMAR, 2001).

Geralmente os óleos essenciais estão associados como mecanismo de defesa das plantas contra fatores bióticos ou abióticos ou até mesmo para atração de polinizadores. Em condições de estresse ocorre mudanças no metabolismo das plantas, sendo que normalmente ocorre aumento no teor de óleo essencial em plantas aromáticas (MANUKYAN, 2011). No entanto, a concentração dos componentes do óleo essencial pode variar tanto em função das características da planta como também das interações ecológicas do vegetal com o ambiente, podendo modificar a quantidade e qualidade das propriedades químicas dos metabólitos como resultado da aclimação das plantas (MOORE et al., 2013). Da mesma forma, a produção de metabólitos secundários é influenciada por fatores genéticos, mas a interação da planta com o ambiente, com microrganismos ou até mesmo com outras plantas, podem gerar alterações tanto na

produção como também na composição química dos óleos essenciais (MORAIS, 2009). Contudo, diversos estudos indicam que fatores ambientais (clima, estação do ano, disponibilidade hídrica, geografia, entre outros) influenciam sobre a produção e composição do óleo essencial de planta aromáticas.

2.3 ESTRESSE HÍDRICO

O déficit hídrico pode ser definido como uma disponibilidade de água insuficiente para as plantas e afeta diretamente o crescimento vegetativo e reprodutivo das culturas, principalmente em função da desidratação celular influenciar sobre os processos fisiológicos. As principais alterações fisiológicas são redução da expansão celular/foliar e das atividades metabólicas, fechamento estomático em função do acúmulo de ácido abscísico (ABA), inibição fotossintética devido a redução das trocas gasosas pelo fechamento estomático, abscisão foliar, alteração na partição do carbono, cavitação, desestabilização das membranas e proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular (TAIZ et al., 2017).

Em solos com saturação de água, as plantas apresentam redução na condutância estomática, reduzindo a taxa de assimilação de CO₂ e conseqüentemente da fotossíntese, modificações nas taxas de transpiração, murcha, inibição de crescimento e abscisão foliar, resultado da hipoxia nas raízes em ambiente alagado, principalmente quando se trata de espécies sensíveis (PAROLIN, 2009; PAROLIN & WITTMANN, 2010). No entanto, em condições de estresse hídrico, as plantas apresentam mecanismos que incluem plasticidade fisiológica, metabólica e morfológica (SCREMIN-DIAS; LORENZ-LEMKE; OLIVEIRA, 2011).

No caso de plantas medicinais e aromáticas, o acúmulo de ABA em condições de estresse hídrico desencadeia mudanças nas concentrações e composição dos metabólitos secundários como taninos, proteínas (prolina), terpenóides, compostos fenólicos, entre outros (FONSECA et al., 2006). Em estudos avaliando diferentes lâminas e intervalos entre irrigação na produção, massa seca, produção e composição do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon ciratus* D.C.), Pinto et al. (2014) observaram que o estresse hídrico moderado com 100% da demanda de água e intervalo de irrigação de sete dias gerou maior produção de matéria seca e produção de óleo essencial com maior concentração de citral, enquanto que com 50% da demanda hídrica e mesmo intervalo de irrigações proporcionou maior produção de óleo essencial. Da mesma forma, avaliando o desempenho de *Aloysia triphylla* em diferentes disponibilidades hídricas e estações do ano, Schwerz et al. (2015) obtiveram maior teor de óleo essencial em 75% e 50% da evapotranspiração de referência, enquanto que a redução na

disponibilidade hídrica resultou em menor produção de biomassa, altura de plantas e área foliar. Além disso, Feitosa et al. (2016) estudando o estresse hídrico no desempenho fisiológico de plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), observaram que em condições de estresse hídrico ocorreu redução da taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração, sendo que a temperatura foliar tende a aumentar. Portanto, o estresse hídrico afeta os processos metabólicos e fisiológicos das plantas, promovendo redução do crescimento, desenvolvimento e produção das culturas.

2.4 SAZONALIDADE

A sazonalidade pode ser definida como um conjunto de variações ambientais regulares, que influenciam sobre crescimento e desenvolvimento das plantas, modificando as características fisiológicas, ecológicas e agrícola dos vegetais. Características fisiológica em função das condições ambientais influenciar os processos metabólicos das plantas; ecológica para formação do ecossistema; e agrônômica para determinar a adaptação e as práticas culturais da cultura, que são dependentes das condições climáticas de determinado local (LOPES & LIMA, 2015).

Os fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, disponibilidade hídrica, assim como fatores relacionados a própria planta como idade, ciclo vegetativo e órgão vegetal, influenciam sobre o rendimento e composição química do óleo essencial das plantas (OZKAN; BAYDAR; ERBAS, 2009; SCHINDLER; SILVA; HEINZMANN, 2018).

As regiões de clima temperado, caracterizam-se por apresentar as estações do ano bem definidas, com verão quente (temperaturas acima de 22°C) e inverno frio (temperaturas inferiores de 10°C), além de chuvas bem distribuídas ao longo do ano. No entanto, essas variações ambientais que ocorrem no decorrer do ano tendem a afetar o crescimento, desenvolvimento e produção de metabólitos secundários, assim como alterar o teor e composição do óleo essencial (TAVEIRA et al., 2003; RAM; RAM; SINGH, 2005). Lacerda et al. (2010) também afirma que os elementos meteorológicos tendem a modificar o desenvolvimento vegetativo, fisiológico e reprodutivo das plantas.

As plantas recebem estímulos em função das modificações ambientais que ocorrem nas distintas estações do ano, podendo provocar alterações fisiológicas, inclusive sobre o metabolismo secundário dos vegetais (GATTI et al., 2014), afetando o crescimento, rendimento e concentração dos componentes químicos dos óleos essenciais (SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2013), ou seja, a sazonalidade influencia sobre a quantidade e qualidade do óleo essencial

das plantas. Alguns trabalhos da literatura demonstram que plantas que produzem óleo essencial apresentam modificações no rendimento em função da variação sazonal. Em *Nectandra grandiflora*, Silva et al. (2015) encontraram maior rendimento de óleo essencial durante a primavera. Da mesma forma, em estudo com *Aloysia triphylla*, Schwerz et al. (2015) concluíram que o cultivo na primavera proporcionou maior produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial da espécie. Por outro lado, maior teor de óleo essencial foram obtidos durante as estações de verão e inverno.

Assim sendo, torna-se fundamental compreender a dinâmica do crescimento vegetativo, assim como o rendimento e qualidade dos metabólitos secundários de *Aloysia triphylla* em função da variação sazonal e de diferentes disponibilidades hídricas.

3 ARTIGO 1 – DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE AFETAM A FITOMASSA E PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS DE *Aloysia triphylla*

Submetido em língua estrangeira para o periódico: Scientia Horticulture.

Situação: Em avaliação.

Disponibilidade hídrica e sazonalidade afetam a fitomassa e pigmentos fotossintéticos de

Aloysia triphylla

Leonardo Antonio Thiesen^{a,*}, Marcos Vinícius Marques Pinheiro^a, Braulio Otomar Caron^a,
Ezequiel Holz^a, Bruna Stringari Altissimo^a, Evandro Holz^a, Denise Schmidt^a.

^a Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa
Maria, *Campus* Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor para correspondência: thiesen07@hotmail.com.

3.1 Resumo: O crescimento e desenvolvimento das plantas são afetados pela disponibilidade hídrica e sazonalidade. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de fitomassa e pigmentos fotossintéticos de plantas de *Aloysia triphylla* submetidas à diferentes disponibilidades hídricas e estações do ano. O experimento foi conduzido em ambiente protegido na Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen no período de agosto de 2015 a março de 2017, em delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com quatro blocos de quatro plantas cada. As quatro disponibilidades hídricas testadas foram 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo, nas quatro estações do ano outono, inverno, primavera e verão. As variáveis avaliadas foram altura de plantas, massa fresca e seca de ramos, massa fresca e seca de folhas, área foliar e pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides). Observou-se que a disponibilidade hídrica e as estações do ano influenciam a produção de fitomassa bem como as análises de pigmentos fotossintéticos da espécie aromática. A baixa disponibilidade hídrica e o cultivo durante o outono e inverno afetam negativamente o crescimento vegetativo. Portanto, para maior produção de fitomassa, recomenda-se o cultivo de *Aloysia triphylla* durante as estações

26 de primavera e verão sob disponibilidade hídrica de 75% e 100% da capacidade de campo. A
27 estação da primavera proporciona maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

28 **Palavras-chave:** Cidró; Massa vegetal; Clorofila; Estação do ano.

29

30 **Water availability and seasonality affect phytomass production and photosynthetic**
31 **pigments of *Aloysia triphylla***

32

33 **3.2 Abstract:** The plant growth and development are affected by water availability and
34 seasonality. Therefore, the objective of this work was to evaluate the phytomass production and
35 photosynthetic pigments of *Aloysia triphylla* plants submitted to different water availability and
36 seasons of the year. The experiment was conducted in a protected environment at the Federal
37 University of Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen from August 2015 to March 2017,
38 in an experimental design of randomized blocks, in a 4x4 factorial scheme, with four blocks of
39 four plants each. The four water availability tested were 25%, 50%, 75% and 100% of the field
40 capacity, in the four seasons of the year, autumn, winter, spring and summer. The evaluated
41 variables were plant height, fresh and dry mass of branches, fresh and dry mass of leaves, leaf
42 area and photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids). It was
43 observed that the water availability and the seasons of the year influence the phytomass
44 production as well as the photosynthetic pigment analyzes of the aromatic species. Low water
45 availability and cultivation during autumn and winter adversely affect vegetative growth.
46 Therefore, for higher phytomass production, it is recommended to cultivate *Aloysia triphylla*
47 during the spring and summer seasons under 75% water availability and 100% field capacity.
48 The spring season provides higher content of photosynthetic pigments.

49 **Keywords:** Cidró; Vegetable mass; Chlorophyll; Season.

50 3.3 Introdução

51 O cidró (*Aloysia triphylla*), pertencente à família Verbenaceae, é uma espécie medicinal
52 e aromática perene nativa da América do Sul. O gênero *Aloysia* contém cerca de 30 espécies
53 distribuídas nas Américas, desde os Estados Unidos da América até a Patagônia (Rojas et al.,
54 2012). Várias espécies foram introduzidas na Europa e norte da África, onde existem pesquisas
55 farmacológicas relacionadas às suas propriedades medicinais (El-Hawary et al., 2012; Felgines
56 et al., 2014). Seu óleo essencial possui diversos componentes químicos, com destaque para o
57 citral, que atribui importância para indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Rojas et al., 2012),
58 além de possuir comprovadas propriedades antimicrobianas (Souza et al., 2017), anestésicas
59 (Becker et al., 2017), efeito ansiolítico (Jiménez-Ferrer et al., 2017), dentre outros. Além disso,
60 a espécie vem despertando interesse na indústria de químicos agrícolas, visto que produz
61 metabólitos secundários com comprovadas propriedades antifúngica, inseticida e repelente
62 (Haber e Clemente, 2013).

63 A produção de fitomassa de plantas é dependente de fatores genéticos e ambientais,
64 sendo que o desempenho agrônomo e o potencial produtivo de cada espécie dependem da
65 interação genótipo-ambiente, que influencia diretamente o crescimento e desenvolvimento
66 vegetal (Pravuschi et al., 2010; Ferreira et al., 2015a). Dentre os fatores ambientais, a
67 sazonalidade afeta crescimento, desenvolvimento e conseqüentemente a produção de fitomassa
68 das plantas, principalmente em função da variação dos elementos meteorológicos que ocorrem
69 durante o ano, sendo fator limitante para diversas culturas (Ferreira et al., 2015b; Schwerz et
70 al., 2015).

71 A variação sazonal está associada a fatores ambientais que resultam em estresse abiótico
72 às plantas, dentre esses destaca-se a disponibilidade hídrica, que pode provocar estresse tanto
73 pela deficiência ou excesso de água, e assim, limita o crescimento e produtividade das plantas,
74 reduzindo o rendimento dos cultivos (Farroq et al., 2012; Oz et al., 2015), em função da

75 diminuição das taxas fotossintéticas (Johari-Pireivatlou et al., 2010; Osakabe et al., 2014). Essa
76 redução ocorre devido a influência direta no metabolismo vegetal que provoca diversas
77 respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, tais quais a produção de espécies reativas
78 de oxigênio (EROs), capazes de danificar as estruturas celulares (Misra et al., 2011; Rao e
79 Chaitanya, 2016), ocasionando o fechamento estomático e limitando a entrada de dióxido de
80 carbono (CO₂) nas folhas, o que inibe a fotossíntese e assim, a produção de fotoassimilados, o
81 que impactará na produção de fitomassa (redução da parte aérea, aceleração da senescência e
82 abscisão foliar) (Wang et al., 2008; Ferrari et al., 2015).

83 A espécie *Aloysia triphylla* pode se tornar alternativa de cultivo para diversificação de
84 propriedades rurais com alto valor agregado por área, e para isso, torna-se essencial determinar
85 condições de crescimento ideais para que as plantas alcancem elevada produção de fitomassa
86 e, concomitantemente, atingir maior rendimento de óleo essencial por unidade de área. Diante
87 do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a produção de fitomassa e pigmentos
88 fotossintéticos de plantas de *Aloysia triphylla* submetidas à diferentes disponibilidades hídricas
89 e à sazonalidade.

90

91 **3.4 Materiais e métodos**

92 3.4.1 Condições de cultivo e propagação da espécie

93 O trabalho foi conduzido em ambiente protegido na área experimental da Universidade
94 Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen, situado a 27° 23' S, 53° 25' O e 493 m
95 de altitude, no período de agosto de 2015 a março de 2017. Pela classificação de Köppen, o
96 clima da região é do tipo Cfa - temperado úmido com verão quente e temperaturas máximas do
97 ar maiores que 22 °C nos meses mais quentes (Alvares et al., 2013). O ambiente protegido foi
98 constituído por uma estrutura em arco de aço galvanizado, disposta na direção Leste-Oeste,

99 com dimensões de 10 x 20 m e 3,0 m de pé direito, coberta com filme de polietileno de baixa
100 densidade transparente com 150 μ m de espessura.

101 As mudas de *Aloysia triphylla* foram propagadas vegetativamente pelo método da
102 miniestaquia. Para isso, utilizou-se placas de espumas fenólicas (dimensões de 2x2x5 cm),
103 lavadas em água corrente para eliminação de prováveis compostos resultantes do processo de
104 industrialização. O procedimento da miniestaquia consistiu da retirada de pequenas estacas com
105 três gemas (aproximadamente 10 cm de comprimento) de plantas matrizes, sendo desinfestadas
106 em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante um minuto, e posterior lavagem
107 em água destilada. Utilizou-se uma célula da espuma fenólica para cada miniestaca,
108 introduzindo-se uma gema no interior da placa e duas para fora. As estacas foram mantidas
109 sobre bancada por 68 dias com subirrigação constante, sendo os turnos de rega controlados
110 através de temporizador, com 15 minutos ligados e 60 minutos desligados. No período noturno
111 realizou-se apenas dois períodos de irrigação de 15 minutos cada, sendo que após passar pela
112 espuma fenólica, a solução retornava para o reservatório.

113 Após 13 dias as estacas passaram a receber solução nutritiva com 25% da formulação
114 proposta por Furlani (2009), mantendo a condutividade elétrica e o pH em, aproximadamente,
115 300 μ S e 6,0, respectivamente. Passados 68 dias, as miniestacas foram transplantadas para vasos
116 de cinco litros contendo substrato comercial Carolina[®], permanecendo por mais 84 dias, para a
117 completa formação das mudas.

118

119 3.4.2 Condições experimentais e variáveis de crescimento

120 Para a condução do experimento, mudas de 152 dias foram transplantadas para vasos
121 plásticos de 14,3 litros pintados de branco na parede externa, com a finalidade de promover a
122 maior reflexão e menor absorção da radiação solar, evitando assim o aquecimento e a perda
123 excessiva de água pelo processo de evaporação do solo. Cada vaso foi preenchido com fina

124 camada de brita (3 kg) e mistura de solo peneirado + 10% de esterco bovino curtido. Com o
125 mesmo objetivo de evitar o processo de evaporação foi adicionado bagaço de cana-de-açúcar
126 (100 g) para formar cobertura em cada vaso de cultivo.

127 O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC), esquema
128 fatorial 4x4, com quatro blocos, sendo a unidade experimental composta por quatro plantas. Os
129 quatro níveis de disponibilidade hídrica testadas foram 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade
130 de campo, sendo avaliadas nas quatro estações do ano do outono, inverno e primavera de 2016
131 e verão 2016/2017, sendo as estações do ano consideradas como fator sazonalidade.

132 A restrição hídrica foi iniciada aos 45 dias antes da coleta das plantas para avaliação, ou
133 seja, a partir do período que corresponde à metade de cada estação do ano. Antes do início da
134 restrição hídrica, todas as plantas foram irrigadas com 100% da capacidade de campo. O manejo
135 hídrico foi baseado na umidade do solo, determinado pela pesagem diária dos vasos, com
136 auxílio de balança digital. A reposição da água evapotranspirada foi realizada sempre que a
137 variação entre a massa inicial do vaso e a massa obtida no dia da avaliação tornava-se igual ou
138 superior a 2%. Assim, a diferença entre as massas correspondia à quantidade de água a ser
139 completada, assumindo que a água apresenta relação massa/volume 1:1.

140 No final de cada estação do ano foram avaliadas as variáveis altura de plantas, massa
141 fresca e seca de ramos, massa fresca e seca de folhas e área foliar e pigmentos fotossintéticos
142 das plantas (clorofila *a*, *b* e carotenoides).

143 A altura de plantas foi determinada a partir da medição do ápice do maior ramo até o
144 colo da planta. Para determinar massa fresca e seca de ramos e de folhas, realizou-se poda nas
145 plantas, aproximadamente 10 cm acima do solo deixando-se gemas para rebrote, sendo o
146 material levado ao laboratório para separação e pesagem dos órgãos vegetativos. Para
147 determinar a massa seca levou-se os ramos e folhas para estufa de secagem com temperatura
148 em torno de 60 °C, até atingirem massa constante. A área foliar foi determinada pelo “método

149 de discos” (Benincasa, 1988), que consiste na retirada dos discos do limbo foliar com número
150 e área conhecidos. Os discos também foram mantidos em estufa de secagem a 60 °C, para a
151 obtenção da massa seca. Posteriormente, a área foliar foi estimada a partir da equação 1:

$$152 \quad AF = (ND * AD * MSF)/MSD \quad (1)$$

153 Onde: AF = Área foliar (cm²); ND = Número de discos; AD = Área do disco (cm²); MSF =
154 Massa seca de folhas (g); MSD = Massa seca de discos (g).

155

156 3.4.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

157 Para os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides), foram utilizados discos
158 foliares das folhas adultas localizadas no quarto nó do ápice em direção à base do maior ramo,
159 de todas as plantas. A unidade experimental foi composta por quatro tubos de ensaio para
160 extração dos pigmentos, que correspondia as plantas de avaliação de cada bloco. Foram
161 retirados cinco discos foliares de material fresco, de 5 mm de diâmetro cada e transferidos para
162 tubos de ensaio contendo 5 mL de solução de dimetilsulfóxido - DMSO (saturado com 5 g L⁻¹
163 de carbonato de cálcio, CaCO₃), seguindo a metodologia modificada proposta por Santos et al.
164 (2008). Os discos permaneceram incubados durante 48 horas, cobertos com papel alumínio e
165 mantidos em local escuro. Após este período determinou-se a absorbância das amostras em
166 espectrofotômetro BEL Photonics, modelo SP 1105, utilizando-se cubetas de vidro com 10 mm
167 de caminho óptico, nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm, para clorofila *a*, *b* e
168 carotenoides, respectivamente, sendo apresentados em µg cm⁻².

169 As variáveis determinadas corresponderam a clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*),
170 carotenoides, clorofila total (Chl total), razão clorofila *a/b* (Chl *a/b*) e clorofila
171 total/carotenoides (Total/carot). A clorofila total (Chl total) foi determinada pelo somatório da
172 clorofila *a* e clorofila *b*; a razão *a/b*, pela divisão da clorofila *a* pela *b*; e clorofila

173 total/carotenoides, sendo calculada pela soma das clorofilas *a* e *b* e posterior divisão pelos
174 carotenoides, realizadas para cada repetição.

175

176 3.4.4 Análise estatística

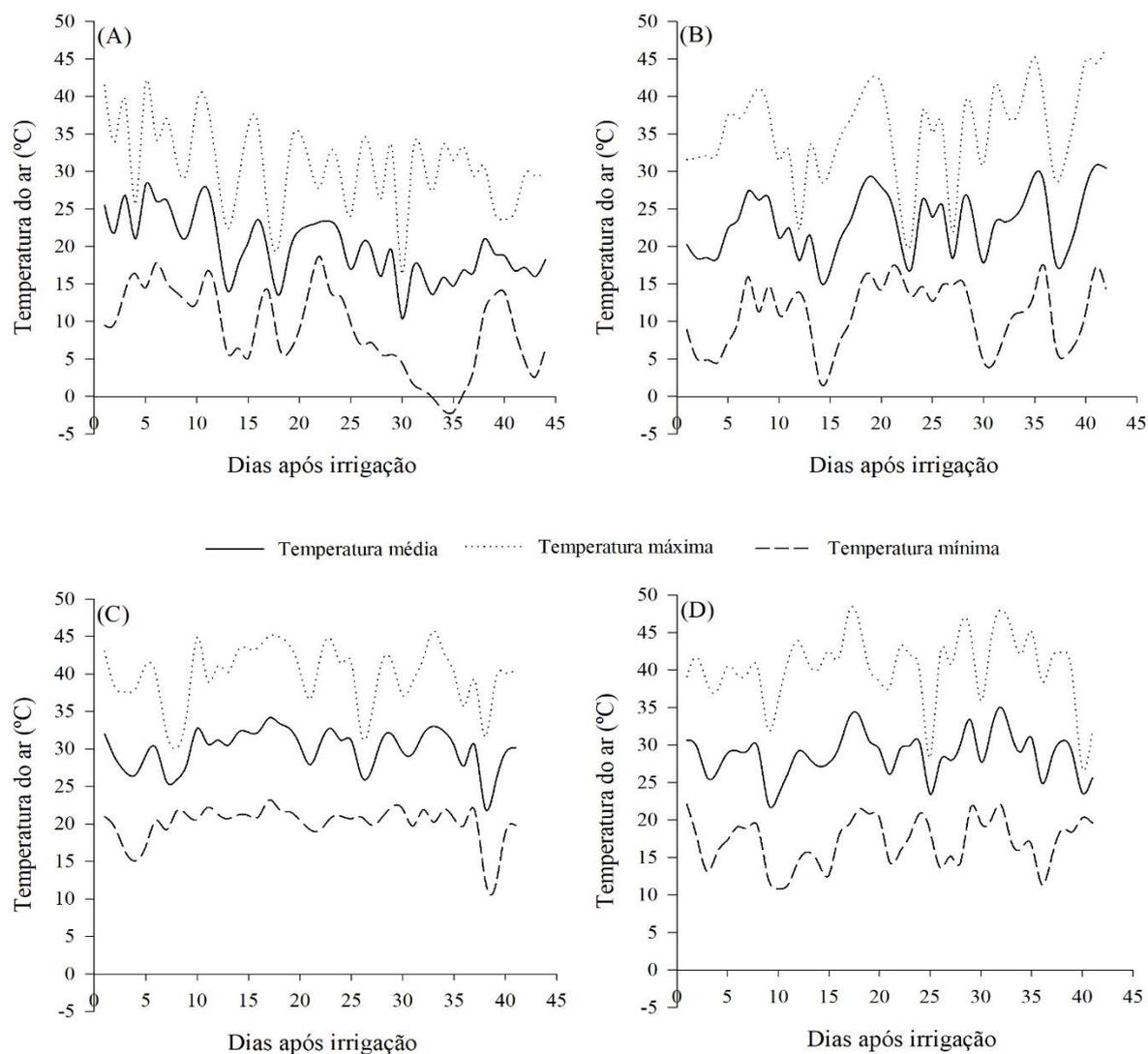
177 Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, realizou-
178 se análise de regressão para dados quantitativos (fator disponibilidade hídrica), e comparação
179 de médias para dados qualitativos (fator sazonalidade) pelo teste Scott e Knott, a 5% de
180 probabilidade, utilizando o programa estatístico Genes (Cruz, 2013).

181

182 3.5 Resultados

183 As condições meteorológicas, no interior do ambiente protegido, durante o período
184 experimental apresentaram elevada amplitude térmica, principalmente entre as estações
185 estudadas. O efeito da sazonalidade demonstrou períodos com temperaturas do ar elevadas,
186 atingindo valores próximos de 50 °C na estação de primavera, e outros, com temperaturas
187 baixas, atingindo valores negativos durante o outono (-0,2, -1,8 e -2,1 °C). Durante o outono
188 foi possível observar temperaturas máximas e mínimas variando entre 41,5 e -2,1 °C,
189 respectivamente, sendo que a temperatura média do período foi de 19,9 °C (Figura 1A). Para a
190 estação de inverno, a temperatura média do período foi superior à observada durante a estação
191 do outono (23,2 °C), porém, este período apresentou elevada amplitude térmica, com
192 temperaturas máximas e mínimas alcançando 46,6 e 2 °C, respectivamente (Figura 1B). Na
193 primavera, as temperaturas se situaram entre 47,9 e 10,8 °C, tendo como temperatura média do
194 período 28,7 °C (Figura 1C). Para o verão a temperatura média foi de 30 °C, com temperaturas
195 máximas e mínimas de 45,8 e 11,6 °C, respectivamente (Figura 1D).

196



197

198 **Fig. 1.** Temperatura do ar máxima, mínima e média registradas no interior do ambiente
 199 protegido nas estações de outono (A), inverno (B) e primavera (C) de 2016 e verão (D)
 200 2016/2017, durante o período de condução de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades
 201 hídricas.

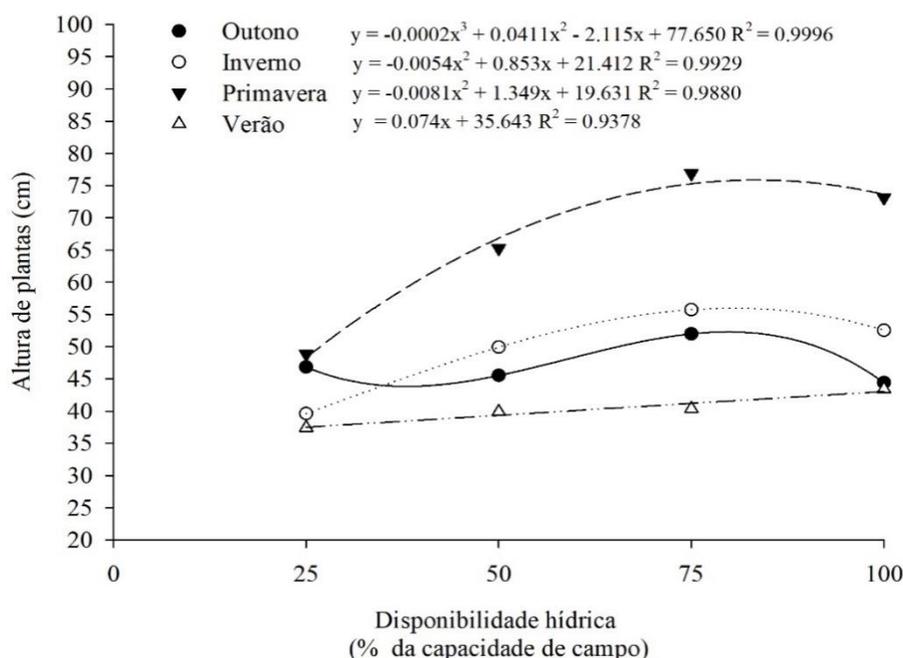
202

203 Pela análise de variância, foi possível observar que as variáveis altura de plantas, massa
 204 fresca e seca de folhas e de ramos e área foliar foram significativas para a interação dos fatores
 205 sazonalidade x disponibilidade hídrica, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Para as variáveis
 206 clorofila *b*, relação clorofila total/carotenoides e razão de clorofila *a/b* houve diferença

207 significativa apenas para o fator sazonalidade. Para as variáveis clorofila *a*, carotenoides e
 208 clorofila total, apenas para os dois fatores individuais.

209 As maiores alturas de plantas foram observadas na estação da primavera, enquanto que
 210 menores foram verificadas na estação do verão e com disponibilidade hídrica de 25% da
 211 capacidade de campo para a maioria das estações. As equações de regressão apresentaram
 212 resposta cúbica para o outono e quadrática para o inverno e primavera. Para estas três estações,
 213 a disponibilidade hídrica de 75% da capacidade de campo proporcionou maior altura de plantas
 214 (51,9; 55,7 e 76,9 cm, respectivamente). Para o verão, houve resposta linear crescente com
 215 superioridade a 100% da capacidade de campo, com altura média de 43,4 cm (Figura 2).

216



217

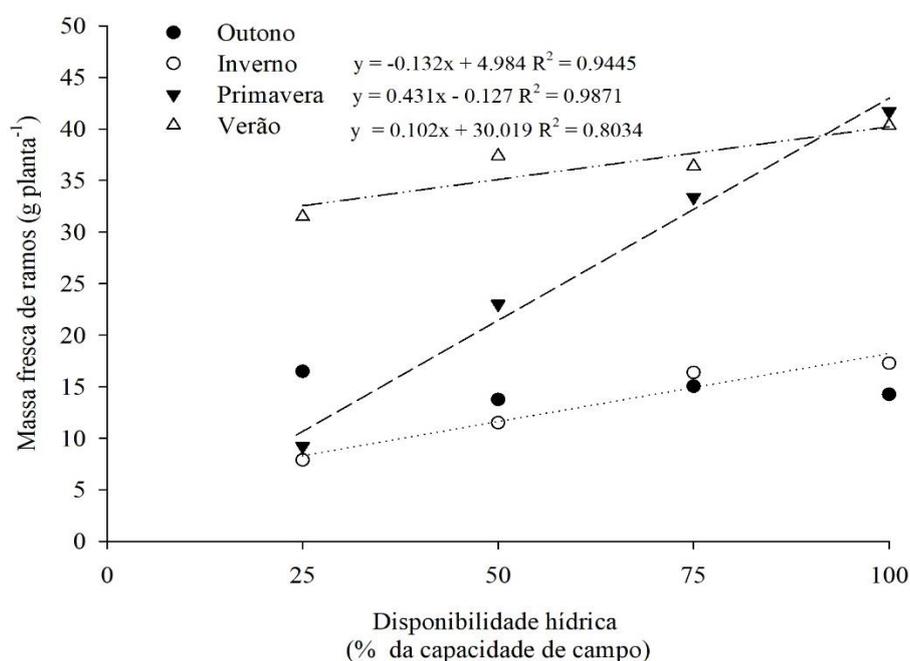
218 **Fig. 2.** Altura de plantas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas, durante
 219 as quatro estações do ano.

220

221 Para a variável massa fresca de ramos observou-se que o verão foi superior as demais
 222 estações, seguido da primavera. No entanto, para estas duas estações, em 100% da capacidade
 223 de campo, para esta variável foram observados valores semelhantes (41,7 e 40,3 g planta⁻¹,

224 respectivamente) (Figura 3). Para as estações do verão, houve resposta linear crescente em
 225 função do aumento da disponibilidade hídrica, sendo a menor média de 31,5 g planta⁻¹. A
 226 mesma tendência foi observada para o inverno, no entanto a menor média foi de 7,9 g planta⁻¹
 227 e a maior de 17,3 g planta⁻¹. Para a estação do outono, nenhuma equação de regressão foi
 228 significativa ($p > 0,05$), sendo a média de 14,9 g planta⁻¹. Para a estação de primavera, a regressão
 229 que melhor se ajustou foi a linear, em que resultados superiores foram encontrados para a
 230 disponibilidade hídrica de 100% da capacidade de campo (Figura 3).

231



232

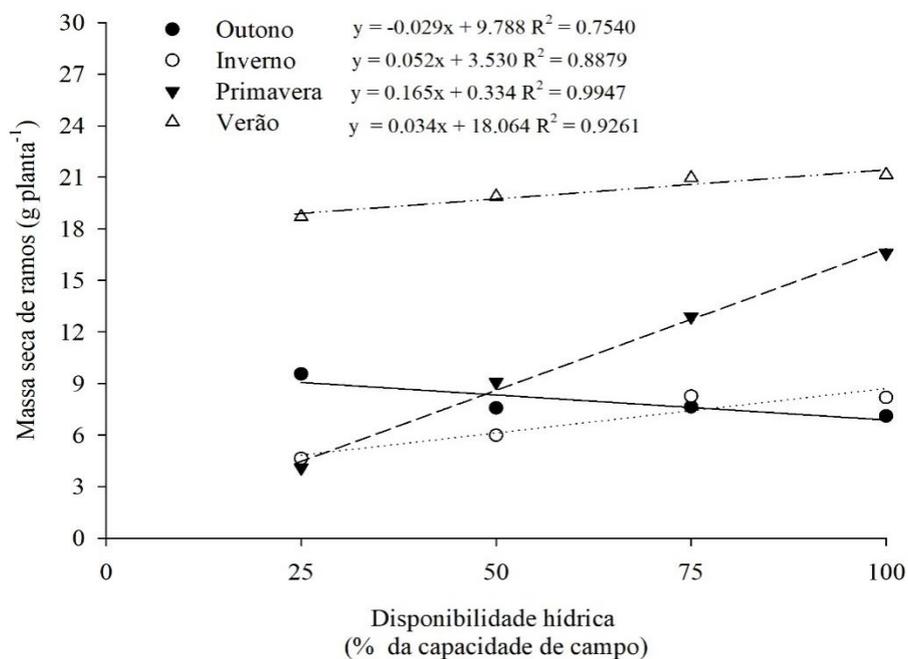
233 **Fig. 3.** Massa fresca de ramos de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas
 234 durante as quatro estações do ano.

235

236 Para a massa seca de ramos, observou-se resposta linear crescente em função da
 237 disponibilidade hídrica para todas as estações, com exceção para o outono. Verificou-se
 238 superioridade no verão em todas as condições hídricas, com médias de 18,698, 19,886, 20,971
 239 e 21,153 g planta⁻¹ para 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo, respectivamente. Na

240 estação de outono, houve resposta linear decrescente, sendo que 25% da capacidade de campo,
 241 apresentou maior acúmulo de massa seca ($9,552 \text{ g planta}^{-1}$) (Figura 4).

242

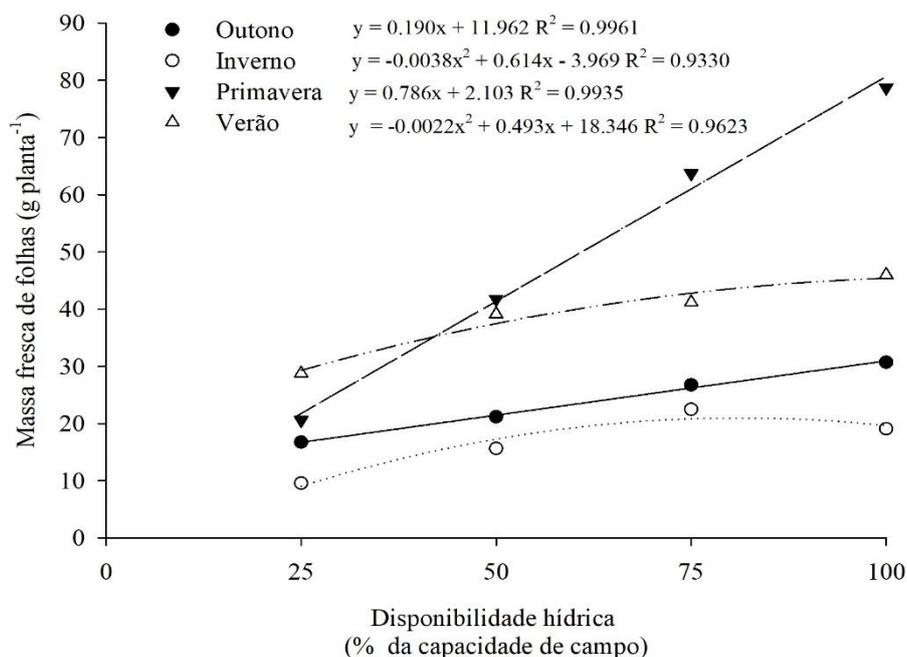


244 **Fig. 4.** Massa seca de ramos de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas
 245 durante as quatro estações do ano.

246

247 Quanto à massa fresca de folhas observou-se maiores médias na primavera e as menores
 248 no inverno. Para as estações de outono e primavera houve resposta linear crescente em função
 249 do aumento da disponibilidade hídrica, em que resultado superior foi encontrado com
 250 disponibilidade hídrica de 100% da capacidade de campo ($30,689$ e $78,752 \text{ g planta}^{-1}$,
 251 respectivamente). Para as demais estações, a linha de tendência que melhor se ajustou foi a
 252 quadrática, sendo que no inverno a massa fresca de folhas foi superior com a disponibilidade
 253 hídrica de 75% da capacidade de campo ($22,456 \text{ g planta}^{-1}$), enquanto que para o verão com
 254 100% da capacidade de campo ($45,981 \text{ g planta}^{-1}$) (Figura 5).

255



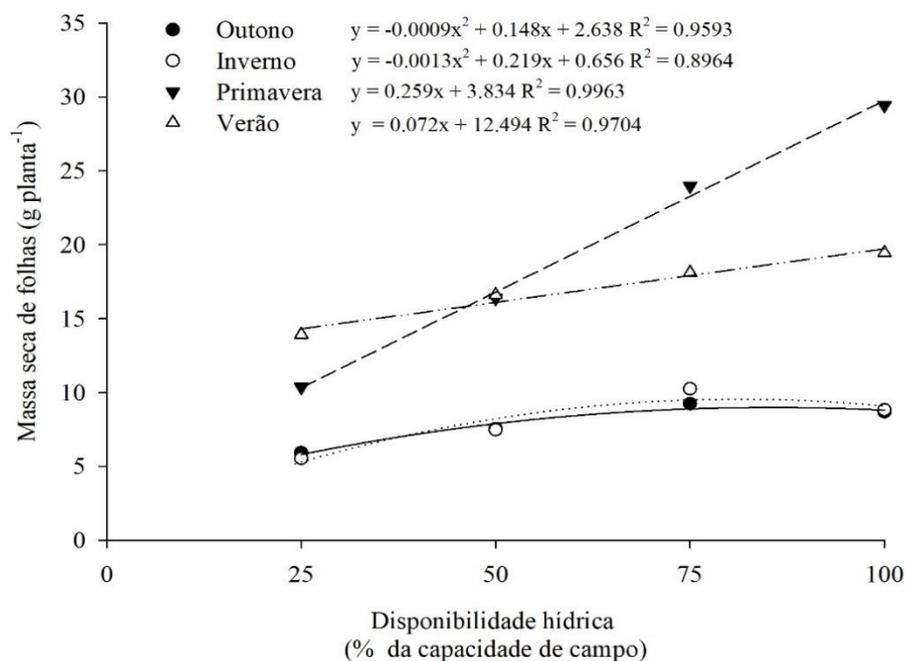
256

257 **Fig. 5.** Massa fresca de folhas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas
 258 durante as quatro estações do ano.

259

260 A massa seca de folhas mostrou tendência semelhante à massa fresca. As maiores
 261 médias foram observadas na primavera e as menores no outono e inverno. Para as estações de
 262 outono e inverno, a linha de tendência que melhor se ajustou foi a quadrática, com maiores
 263 acúmulos na disponibilidade hídrica de 75% da capacidade de campo. Para primavera e verão,
 264 houve resposta linear crescente no acúmulo de massa seca de folhas, sendo que na primavera e
 265 verão foram observadas médias de 29,438 e 19,453 g planta⁻¹ com 100% da capacidade de
 266 campo, respectivamente. A disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de campo e o cultivo
 267 durante as estações de outono e inverno afetaram negativamente o acúmulo de massa fresca e
 268 seca de folhas (Figura 6).

269



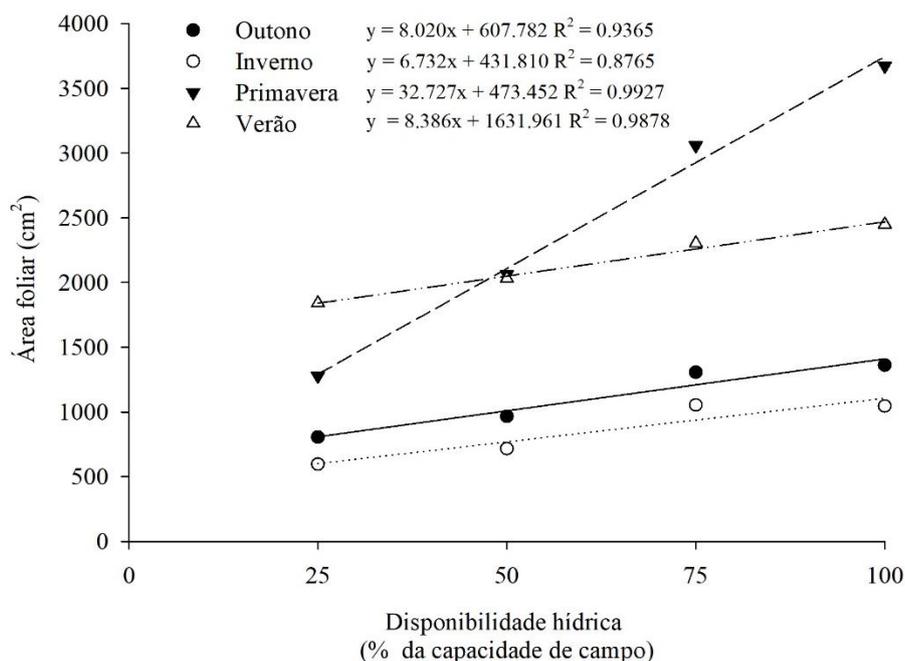
270

271 **Fig. 6.** Massa seca de folhas de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas
 272 durante as quatro estações do ano.

273

274 Para a variável área foliar, observou-se resultado semelhante aos obtidos para massa
 275 seca de folhas. Conforme equações de regressão, para todas as estações houve resposta linear
 276 crescente de área foliar em função da disponibilidade hídrica. Houve superioridade na
 277 primavera e no verão, sendo que a área foliar nestas duas estações, na disponibilidade hídrica
 278 de 25% da capacidade de campo, foram maiores que a de 100% nas estações do outono e
 279 inverno. A área foliar foi intensamente reduzida quando o cultivo de *Aloysia triphylla* ocorreu
 280 durante as estações de outono e inverno e sob baixas disponibilidades hídricas (Figura 7).

281



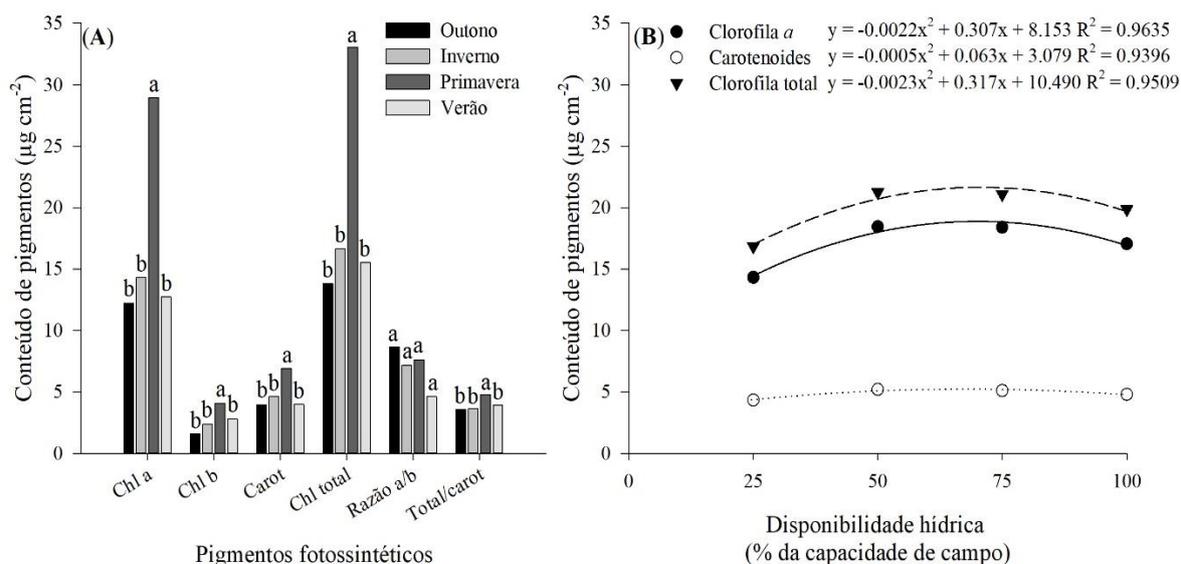
282

283 **Fig. 7.** Área foliar de *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as quatro
 284 estações do ano.

285

286 Quanto aos pigmentos fotossintéticos, foi possível observar que a *Aloysia triphylla*
 287 apresentou variações nos pigmentos fotossintéticos em função das estações do ano e também
 288 quanto às diferentes disponibilidades hídricas. Na primavera houve superioridade significativa
 289 para as variáveis clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, clorofila total e razão clorofila
 290 total/carotenoides (28,96; 4,08; 6,90; 33,05 e 4,80 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente). Para a variável
 291 razão clorofila *a/b*, não houve diferença significativa entre as estações estudadas (Figura 8A).

292



293 Pigmentos fotossintéticos

294 **Fig. 8.** Conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides (Carot), clorofila total

295 (Chl total), razão clorofila *a/b* (Razão *a/b*) e razão clorofila total/carotenoides (Total/carot) de

296 *Aloysia triphylla* significativos para o fator sazonalidade (A) e clorofila *a*, carotenoides e

297 clorofila total significativos para o fator disponibilidade hídrica (B). *Médias seguidas pelas mesmas

298 letras dentro de cada variável não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de

299 probabilidade.

300

301 Para clorofila *a*, carotenoides e clorofila total observou-se linha de tendência quadrática

302 em função do aumento da disponibilidade hídrica (Figura 8B). Os maiores conteúdos de

303 clorofila *a* e clorofila total foram obtidos com disponibilidade hídrica de 50% e 75% da

304 capacidade de campo e, menores conteúdos com 25% e 100% da capacidade de campo. Para os

305 carotenoides, houve pequena variação entre as diferentes disponibilidades hídricas, com

306 maiores valores encontrados em 50% da capacidade de campo.

307

308 3.6 Discussão

309 A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível observar que a

310 disponibilidade hídrica e a sazonalidade influenciam e afetam diretamente o crescimento e

311 desenvolvimento das plantas. Para a cultura da *Aloysia triphylla*, o cultivo em estações com
312 intensa luminosidade e temperaturas mais elevadas (primavera e verão) e com maiores
313 disponibilidades hídricas favoreceram o crescimento e o acúmulo de fitomassa. Este resultado
314 foi confirmado devido às respostas quanto aos pigmentos fotossintéticos, pois é em função do
315 conteúdo de clorofila e/ou carotenoides presentes nas estruturas foliares que ocorre a
316 transformação da energia luminosa em carboidratos e, por fim em matéria seca.

317 A elevada amplitude térmica, no cultivo de *Aloysia triphylla*, pode afetar processos
318 fisiológicos nas plantas. Por exemplo, em temperaturas elevadas as plantas apresentam redução
319 da condutância estomática, e conseqüentemente redução da fotossíntese, que pode justificar os
320 resultados obtidos no verão nas variáveis relacionadas a massa de folhas e área foliar. Por outro
321 lado, temperaturas baixas reduzem a atividade das enzimas responsáveis pelas reações da
322 fotossíntese, levando a fotoinibição do fotossistema I e as vezes do fotossistema II, além de
323 permitir a formação de EROs (Zhang e Scheller, 2004; Yang et al., 2017; Awasthi et al., 2015),
324 bem como reduzir a flexibilidade e fluidez da membrana (Raju et al., 2018).

325 Além da temperatura, outros fatores meteorológicos ocorrem de maneira diversificada
326 durante as estações do ano (como radiação solar e umidade relativa do ar) afetando o
327 crescimento e desenvolvimento vegetal, principalmente de espécies que apresentam dormência
328 (Pinto e Bertolucci, 2002; Correa Junior e Scheffer, 2018). Brant et al. (2008), confirmam que
329 *Aloysia triphylla* apresenta maior crescimento vegetativo em meados de outubro (estação da
330 primavera), atingindo máximo crescimento na metade do verão, quando inicia a diferenciação
331 floral, em torno do mês de fevereiro. Essas afirmações justificam a maior fitomassa e área foliar
332 encontradas durante a primavera, visto que é uma espécie de clima tropical e subtropical e por
333 essa estação proporcionar melhores respostas quanto aos pigmentos fotossintéticos, e
334 conseqüentemente maior crescimento da cultura. Por outro lado, as plantas podem perder todas
335 as folhas durante o inverno em função de apresentar dormência diante de baixas temperaturas

336 (Prochnow et a., 2016), reduzindo área foliar e produção de fitomassa. Além disso, o
337 decréscimo da massa seca de ramos diante do aumento da disponibilidade hídrica pode se
338 justificar como uma alternativa da planta reduzir o crescimento, evitando a brotação e
339 acumulando reservas para suportar as temperaturas baixas, pois a disponibilidade hídrica não
340 foi o fator limitante, e sim a temperatura.

341 A altura de plantas apresentou resultados inferiores durante o verão, no entanto, essa
342 redução foi compensada pela maior ramificação lateral, visto que a massa fresca e seca de ramos
343 foram elevados nessa estação, podendo ser justificado pelo maior número de podas realizadas
344 após cada final de estação, quando comparados às demais. Outro fator que pode justificar a
345 menor altura de plantas no verão, é a intensa radiação solar incidente da estação, no qual as
346 plantas não necessitam crescer em busca de luminosidade, e mesmo assim produzindo elevada
347 quantidade de fitomassa, em função da luminosidade estar com valores elevados neste período.
348 O ponto de compensação luminosa refere-se à quantidade mínima de radiação solar necessária
349 para produzir fotoassimilados e promover crescimento das plantas (Perin et al., 2018). Diante
350 disso, nas estações de outono e inverno, a baixa disponibilidade de radiação incidente afetou a
351 altura das plantas e causou menor acúmulo de matéria seca da cultura.

352 Sob condições de estresse hídrico observa-se impacto negativo para todas as variáveis
353 de crescimento, pois a deficiência hídrica afeta processos metabólicos dos vegetais, como
354 redução da divisão, multiplicação e alongação celular nos meristemas apicais. O crescimento e
355 desenvolvimento das plantas ocorre pelo processo de mitose, ou seja, através de multiplicação
356 celular com posterior alongação e expansão do corpo do vegetal e aumento da fitomassa, sendo
357 este processo afetado por fatores externos como luminosidade, temperatura e disponibilidade
358 hídrica (Almeida e Rodrigues, 2016).

359 O maior incremento dos ramos, folhas e área foliar com aumento da disponibilidade
360 hídrica, para o verão e primavera, está relacionado às temperaturas de cada período, uma vez

361 que nestas estações as temperaturas foram mais elevadas (Figura 1C e 1D). Em estudo com a
362 mesma espécie, Prochnow et al. (2016) encontraram maiores resultados de massa fresca e seca
363 de ramos e massa seca de folhas no cultivo de verão, seguido pelo outono, primavera e inverno,
364 respectivamente, independente do estresse hídrico. Além disso, Schmidt et al. (2017) avaliando
365 a resposta fisiológica de *Aloysia triphylla* em duas estações do ano, observaram que o cultivo
366 durante o verão apresentou melhores condições de radiação, temperatura foliar e transpiração,
367 quando comparado ao cultivo de inverno. Esses resultados estão de acordo com o presente
368 estudo, em que a estação do verão possibilitou superioridade para a maioria das variáveis de
369 crescimento quando comparado com o inverno, porém com variações quanto às diferentes
370 disponibilidades hídricas; isso porque de acordo com Ferrari et al. (2015), o estresse hídrico
371 promove alterações na planta como redução do potencial hídrico, fechamento estomático,
372 aceleração da senescência e abscisão foliar. Essas alterações podem justificar a resposta das
373 plantas submetidas às menores disponibilidades hídricas, uma vez que o estresse hídrico
374 promoveu a abscisão foliar e, conseqüentemente, redução da fitomassa e área foliar.

375 A redução no crescimento das plantas está diretamente relacionada à redução da área
376 foliar durante a fase vegetativa, pois plantas submetidas às condições de deficiência hídrica
377 além da redução da abertura estomática tendem a apresentar murcha e enrolamento da folha de
378 maneira a reduzir a exposição da área fotossintética, afetando diretamente a fotossíntese (Souza
379 et al., 2013; Ferrari et al., 2015). No presente trabalho, visivelmente as plantas apresentavam
380 enrolamento das folhas e, conseqüentemente redução da área de exposição das folhas,
381 resultando em menor absorção da radiação solar. Gonzalez-Sanpedro et al. (2008) relatam que
382 o aumento da área foliar proporciona aumento na capacidade da planta em absorver a radiação
383 fotossinteticamente ativa para o processo fotossintético e posteriormente utilizá-la nos
384 fotoassimilados para incremento da produção.

385 Em condição de déficit hídrico, o principal mecanismo de defesa da planta é o
386 fechamento estomático, em função da produção do hormônio ácido abscísico (ABA), que atua
387 diminuindo a pressão de turgor das células-guarda (Patakas et al. 2010; Zhao et al., 2001), e
388 assim, reduz a perda de água por transpiração. Além disso, o ABA também desempenha funções
389 que envolvem a absorção de água e controle hidráulico da planta, para suportar o estresse
390 hídrico, visto que é sintetizado nas raízes, e as células guardas também podem servir como fonte
391 deste hormônio vegetal (Kuromori et al., 2018). Por outro lado, o fechamento estomático reduz
392 a entrada de CO₂ nas folhas, diminuindo o processo fotossintético e conseqüentemente a
393 produção de matéria seca. Neste trabalho verificou-se que as plantas cultivadas nas estações de
394 outono e inverno e com baixas disponibilidades hídricas (25% e 50% da capacidade de campo),
395 apresentaram redução na produção de massa fresca e seca de folhas e área foliar, em função do
396 estresse hídrico e da sazonalidade promoverem fechamento estomático e abscisão foliar, como
397 resposta da sinalização hormonal e pelo fato das plantas entrar em dormência nos períodos mais
398 frios, tendendo a perder suas folhas.

399 Por se tratar de planta C3, a *Aloysia triphylla* apresenta o processo de fotorrespiração,
400 que é um fator que afeta negativamente o crescimento e acúmulo de fitomassa das culturas. A
401 fotorrespiração pode ocorrer nas plantas em taxas bastante elevadas, principalmente em
402 condições de alta temperatura e baixa disponibilidade hídrica, pois nestas condições a enzima
403 rubisco, presente nos cloroplastos, utiliza a molécula de oxigênio (O₂) ao invés do CO₂,
404 favorecendo a atividade oxigenase na rubisco (Hagemann e Bauwe, 2016); o que pode ter sido
405 fator prejudicial ao crescimento e produção de fitomassa de *Aloysia triphylla*, principalmente
406 quando submetidas às menores disponibilidades hídricas.

407 De maneira geral, as plantas apresentaram respostas positivas com o aumento da
408 disponibilidade hídrica, para as variáveis altura de plantas, massa fresca e seca de ramos, massa
409 fresca e seca de folhas e área foliar. Respostas semelhantes a estas, também foram observadas

410 por Silva et al. (2002) com *Melaleuca alternifolia*, Carvalho et al. (2003) com *Artemisia* e
411 Schwerz et al. (2015) com *Aloysia triphylla*, em que maiores condições hídricas favoreceram a
412 produção de massa fresca e seca de plantas, enquanto a deficiência hídrica afetou essas
413 variáveis.

414 As respostas das plantas diante às condições de disponibilidade hídrica e sazonalidade
415 estão relacionadas aos pigmentos fotossintéticos, sendo que os maiores conteúdos de clorofila
416 encontrados na primavera demonstram que nessa estação as plantas apresentaram as melhores
417 condições meteorológicas para crescimento e desenvolvimento, em função do aumento da
418 capacidade fotossintética. Hendry e Price (1993) e Blum (2005) relatam que os maiores
419 conteúdos de clorofila nas folhas indicam maior eficiência fotossintética pelas plantas e maior
420 produção final da cultura. Portanto, maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos (clorofila
421 *a*, clorofila *b*, total e carotenoides) encontrados no cultivo da primavera, associado a
422 temperaturas elevadas, aumento da intensidade luminosa e disponibilidade hídrica, favorecem
423 o processo fotossintético, e conseqüentemente, a produção de fitomassa.

424 O crescimento e a produção das culturas são definidos pela fotossíntese, sendo que estes
425 dependem da interceptação e da característica espectral da luz absorvida pela área foliar
426 (Maldaner et al., 2009). Diante disso, a avaliação de clorofila torna-se uma importante variável
427 para avaliar os efeitos de deficiência hídrica e da sazonalidade, pois a folha é o principal órgão
428 responsável pelo processo fotossintético, sendo que a pigmentação foliar tende a variar em
429 função do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, estruturas internas e características
430 intrínsecas de cada espécie vegetal (Santos et al., 2014).

431 A energia da radiação solar atinge os órgãos externos da folha e posteriormente
432 difundem-se para o mesófilo foliar, sendo absorvidas pelos cloroplastos e finalmente utilizada
433 para o processo fotossintético (Ponzoni et al., 2012). A maior concentração de cloroplastos
434 ocorre na porção superior do mesófilo foliar, onde estão as clorofilas e carotenoides, em função

435 de ser a região que recebe maior quantidade de radiação solar (Chen et al., 2015). Com isso,
436 pode-se inferir que menor conteúdo de pigmentos pode resultar em menor taxa fotossintética e
437 produção de fitomassa, como observadas naquelas plantas cultivadas durante outono e inverno
438 e sob condições de deficiência hídrica.

439 A redução do conteúdo de clorofila na folha também pode estar relacionada à aceleração
440 da senescência foliar causada pela deficiência hídrica (Efeoğlu et al., 2009). As plantas
441 submetidas à menor disponibilidade hídrica apresentaram maior senescência foliar, como forma
442 de tolerar a falta de água, reduzindo a transpiração e a razão dreno-fonte. Antes de ocorrer a
443 senescência foliar, as folhas apresentam sintomas de amarelecimento, ou seja, as clorofilas
444 começam a ser degradadas e as folhas reduzem a pigmentação verde (Chaves e Oliveira, 2004).
445 Portanto, o processo de degradação da clorofila e senescência foliar justifica os menores
446 conteúdo dos pigmentos, visto que a senescência ocorre primeiramente na parte basal da planta
447 e a determinação da clorofila foi realizada em folhas adultas localizadas próximas da região
448 apical do caule. Além disso, a degradação das clorofilas também pode justificar os resultados
449 inferiores encontrados nas plantas submetidas à disponibilidade hídrica de 25% de capacidade
450 de campo.

451 Os menores conteúdos de pigmentos encontrados no outono e inverno, podem ser
452 justificados pelo início das perdas das folhas nos períodos mais frios (geralmente nos meses de
453 maio e junho), pois trata-se de uma planta que apresenta dormência em função de baixas
454 temperaturas (Paulus et al., 2013). A perda de folhas pode ocorrer mesmo em condições de
455 ambiente protegido, porém com menor severidade. Portanto, os pigmentos fotossintéticos estão
456 diretamente relacionados à fitomassa e área foliar, demonstrando que o cultivo de *Aloysia*
457 *triphylla* na primavera com água disponível, permite que as plantas apresentem maior
458 pigmentação fotossintética, o que reflete em maior produção de massa fresca e seca de folhas e
459 área foliar.

460 Assim sendo, conclui-se que mesmo em condições de ambiente protegido, a baixa
461 disponibilidade hídrica e o cultivo durante as estações de outono e inverno afetam
462 negativamente o crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla*. Recomenda-se o cultivo desta
463 espécie durante as estações de primavera e verão sob disponibilidade hídrica de 75% e 100%
464 da capacidade de campo, pois favorecem a maior produção de fitomassa da cultura. A estação
465 da primavera proporciona maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos, indicando melhores
466 respostas fisiológicas pelas plantas.

467 Este é um importante relato da produção de fitomassa associada aos pigmentos
468 fotossintéticos de *Aloysia triphylla* submetidas em diferentes regimes hídricos durante as
469 estações do ano. Estes resultados são importantes para a condução de novas pesquisas
470 referenciando mudanças anatômicas e fisiológicas, bem como no acúmulo diferencial de óleos
471 essenciais pelas plantas.

472

473 **Agradecimentos**

474 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de
475 bolsa de estudo ao primeiro autor.

476

477 **3.7 Referências**

478

479 Almeida, G.M., Rodrigues, J.G.L., 2016. Development of plants by interference auxins,
480 cytokinins, gibberellins and ethylene. Appl. Res. & Agrotec. 9, 111-117.
481 10.5935/PAeT.V9.N3.13

482

483 Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2013. Köppen's
484 climate classification map for Brazil. Meteorol. Z. 22, 711-728.
485 <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

486

487 Awasthi, R., Bhandari, K., Nayyar, H., 2015. Temperature stress and redox homeostasis in
488 agricultural crops. Front. Environ. Sci. 3, 1-24. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00011>

489

490 Becker, A.G., Luz, R.K., Mattioli, C.C., Nakayama, C.L., Silva, W.D.S., Leme, F.D.O.P.,
491 Mendes, H.C.P.M., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017. Can the essential oil of *Aloysia*
492 *triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous

- 493 freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? *Aquaculture*. 481, 184-190.
494 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007>
495
- 496 Benincasa, M.M.P., 1988. Análise de crescimento de plantas (Noções Básicas). Jaboticabal:
497 FUNEP.
498
- 499 Blum, A., 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential are they
500 compatible, dissonant or mutually exclusive? *Aust. J. Agric. Res.* 56, 1159-1168.
501 <https://doi.org/10.1071/AR05069>
502
- 503 Brant, R.S., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Albuquerque, C.J.B., 2008. Teor do óleo
504 essencial de cidrão (*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton) em função da variação sazonal. *Rev.*
505 *Bras. Pl. Med.* 10, 83-88.
506
- 507 Carvalho, L.M., Casali, V.W., Souza, M.A., Cecon, P.R., 2003. Disponibilidade de água no
508 solo e crescimento de artemísia. *Hortic. Bras.* 21, 726-730.
509
- 510 Chaves, M.M., Oliveira, M.M., 2004. Mechanism underlying plant resilience to water deficits:
511 prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365-2384.
512 <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>
513
- 514 Chen, D., Wan, Z., Zhou, Y., Xiang, W., Zhong, J., Ding, M., Yu, H., Ji, Z., 2015. Tuning into
515 blue and red: europium single-doped nano-glass-ceramics for potential application in
516 photosynthesis. *J. Mater. Chem. C* 3, 3141-3149. 10.1039/c5tc00034c
517
- 518 Corrêa Jr., C., Scheffer, M.C., 2013. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais,
519 Aromáticas e Condimentares. Instituto Emater, Curitiba.
520
- 521 Cruz, C.D., 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and
522 quantitative genetics. *Acta Sci. Agron.* 35, 271-276.
523 <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
524
- 525 Efeoğlu, B., Ekmekçi, Y., Çiçek, N., 2009. Physiological responses of three maize cultivars to
526 drought stress and recovery. *S. Afr. J. Bot.* 75, 34-42.
527 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.06.005>
528
- 529 El-Hawary, S.S., Yousif, M.F., Motaal, A.A.A., Abd-Hameed, L.M., 2012. Bioactivities,
530 phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt.
531 *Bull. Fac. Sci. Cairo Univ.* 50, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2011.12.001>
532
- 533 Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K.H.M., 2012. Drought stress in plants: an
534 overview. *Plant Resp. Drought. Stress.* 1-8. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_1
535
- 536 Felgines, C., Fraisse, D., Besson, C., Vasson, M.P., Texier, O., 2014. Bioavailability of lemon
537 verbena (*Aloysia triphylla*) polyphenols in rats: impact of colonic inflammation. *Br. J. Nutr.*
538 111, 1773-1781. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000026>
539
- 540 Ferrari, E., Paz, A., Silva, A.C., 2015. Déficit hídrico no metabolismo da soja em sementes
541 antecipadas no mato grosso. *Pesq. Agrár. Amb.* 3, 67-77.
542

- 543 Ferreira, S.D., Echer, M.M., Bulegon, L.G., Pastório, M.A., Egewarth, V.A., Yassue, R.M.,
544 Achre, D., 2015a. Influencia de la fertilización nitrogenada y la época de cultivo sobre el
545 rendimiento de hojas de albahaca (*Ocimum basilicum* var. verde Toscana) con fines
546 medicinales. Rev. Cub. Pl. Med. 20, 389-396.
- 547
548 Ferreira, S.D., Bulegon, L.G., Yassue, R.M., Echer, M.M., 2015b. Efeito da adubação
549 nitrogenada e da sazonalidade na produtividade de *Ocimum basilicum* L. R. Bras. Pl. Med. 18,
550 67-73. 10.1590/1983-084X/15_035
- 551
552 Furlani, P.R., 2009. Cultivo de frutas e hortaliças em ambiente protegido. Instituto Frutal,
553 Fortaleza.
- 554
555 Gonzalez-Sanpedro, M.C., Toan, T.L.E., Moreno, J., Kergoat, L., Rubio, E., 2008. Seasonal
556 variations of leaf area index of agricultural fields retrieved from Landsat data. Remote Sens.
557 Environ. 112, 810-824. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.06.018>
- 558
559 Haber, L.L., Clemente, F.M.V.T., 2013. Plantas aromáticas e condimentares: uso aplicado na
560 Horticultura. Embrapa, Brasília.
- 561
562 Hagemann, M., Bauwe, H., 2016. Photorespiration and the potential to improve
563 photosynthesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 35, 109-116.
564 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.014>
- 565
566 Hendry, G.A.F., Price, A.H., 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. Chapman e
567 Hall, London.
- 568
569 Jiménez-Ferrer, E., Santillán-Urquiza, M.A., Alegría-Herrera, E., Zamilpa, A., Noguerón-
570 Merino, C., Tortoriello, J., Navarro-García, V., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata, M., Herrera-
571 Ruiz, M., 2017. Anxiolytic effect of fatty acids and terpenes fraction from *Aloysia triphylla*:
572 Serotonergic, GABAergic and glutamatergic implications. Biomed. Pharmacother. 96, 320-
573 327. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.024>
- 574
575 Johari-Pireivatlou, M., 2010. Effect of soil water stress on yield and proline content of four
576 wheat lines. Afr. J. Biotechnol. 9, 36-40.
- 577
578 Kuromori, T., Seo, M., Shinozaki, K., 2018. ABA Transport and Plant Water Stress
579 Responses. Trends Plant Sci. 23, 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.001>
- 580
581 Maldaner, I.C., Heldwein, A.B., Loose, L.H., Lucas, D.D.P., Guse, F.I., Bertoluzzi, M.P., 2009.
582 Modelos de determinação não-destrutiva da área foliar em girassol. Ciênc. Rural. 39, 1356-
583 1361. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500008>
- 584
585 Misra, A.N., Misra, M., Singh, R., 2011. Nitric oxide ameliorates stress responses in plants.
586 Plant Soil Environ. 57, 95-100. 10.17221/202/2010-PSE
- 587
588 Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P., 2014. Response of plants to water
589 stress. Front. Plant. Sci. 5, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- 590
591 Oz, M.T., Eyidogan, F., Yucel, M., Öktem, H.A., 2015. Functional role of nitric oxide under
592 abiotic stress conditions, in: Khan, M., Mobin, M., Mohammad, F., Corpas, F. (Eds.), Nitric

- 593 Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants. Springer., pp. 21-
594 41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_2
595
- 596 Paulus, D., Valmorbida, R., Toffoli, E., Nava, G.A., 2013. Teor e composição química de óleo
597 essencial de cidrô em função da sazonalidade e horário de colheita. Hortic. Bras. 31, 203-209.
598
- 599 Patakas, A.A., Zotos, A., Beis, A.S., 2010. Production, localisation and possible roles of nitric
600 oxide in drought-stressed grapevines. Aust. J. Grape Wine Res. 16, 203-209.
601 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00064.x>
602
- 603 Perin, L., Peil, R.M.N., Trentin, R., Streck, E.A., Rosa, D.S.B., Hohn, D., Schaun, W.S., 2018.
604 Solar radiation threshold and growth of mini tomato plants in mild autumn/winter
605 condition. Sci. Hortic. 239, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.037>
606
- 607 Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., 2002. Cultivo e processamento de plantas medicinais.
608 UFLA, Lavras.
609
- 610 Ponzoni, F.J., Shimabukuro, Y.E., Kuplich, T.M., 2012. Sensoriamento remoto da vegetação.
611 Oficina de textos, São Paulo.
612
- 613 Pravuschi, P.R., Marques, P.A.A., Rigolin, B.H.M., Santos, A.C.P., 2010. Efeito de diferentes
614 lâminas de irrigação na produção de óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). Acta
615 Sci. Agron. 32, 687-693. [10.4025/actasciagron.v32i4.3160](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i4.3160).
616
- 617 Prochnow, D., Caron, B.O., Thiesen, L.A., Holz, E., Souza, V.Q., Schmidt, D., 2016. Growth
618 and essential oil content of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton due to drought and seasonality.
619 Aust. J. Basic and Appl. Sci. 10, 114-121.
620
- 621 Raju, S.K.K., Barnes, A.C., Schnable, J.C., Roston, R.L., 2018. Low-temperature tolerance in
622 land plants: Are transcript and membrane responses conserved? Plant Sci. 276, 73-86.
623 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.002>
624
- 625 Rao, D.E., Chaitanya, K.V., 2016. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in
626 deciphering drought stress tolerance of crop plants. Biol. Plant. 60, 201-218.
627 <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0584-8>
628
- 629 Rojas, J., Palacios, O., Ronceros, S., 2012. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton
630 (cedrón) sobre el trypanosoma cruzi en ratones. Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica. 29, 61-
631 68.
632
- 633 Santos, R.P., Cruz, A.C.F.D., Iarema, L., Kuki, K.N., Otoni, W.C., 2008. Protocolo para
634 extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. Rev. Ceres, 55,
635 356-364.
636
- 637 Santos, M.S., Feijó, N.S.A., Secco, T.M., Mielke, M.S., Gomes, F.P., Costa, L.C.B., Silva,
638 D.C., 2014. Efeitos do sombreamento na anatomia foliar de *Gallesia integrifolia* (Spreng)
639 Harms e *Schinus terebinthifolius* Raddi. Rev. Bras. Pl. Med. 16, 89-96.
640 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000100013>
641

- 642 Schmidt, D., Caron, B.O., Schwerz, L., Manfron, P.A., Elli, E.F., Schwerz, F., 2017.
643 Physiological response of cidró to different water replacement levels in two seasons of the
644 year. *Hortic. Bras.* 35, 203-209. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-053620170208>.
645
- 646 Schwerz, L., Caron, B.O., Manfron, P.A., Schmidt, D., Elli, E.F., 2015. Biomassa e teor de óleo
647 essencial em *Aloysia triphylla* (l'hérit) Britton submetida a diferentes níveis de reposição
648 hídrica e à variação sazonal das condições ambientais. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 631-641.
649 https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_008
650
- 651 Silva, S.R.S., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Casali, V.W.D., Nascimento, E.A., Pinheiro,
652 A.L., 2002. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo
653 essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Sci. Agron.* 24, 1363-1368.
654 [10.4025/actasciagron.v24i0.2382](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v24i0.2382)
655
- 656 Souza, A.P., Mota, L.L., Zamadei, T., Martin, C.C., Almeida, F.T., Paulino, J., 2013.
657 Classificação Climática e Balanço Hídrico Climatológico no Estado de Mato Grosso. *Nativa*,
658 1, 34-43.
659
- 660 Souza, R.C., Costa, M.M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Schmidt, D., Caron, B.O.,
661 Copatti, C.E., 2017. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla*
662 and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microb. Pathog.* 113, 29-33.
663 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.013>
664
- 665 Wang, R., Chen, S., Zhou, X., Shen, X., Deng, L., Zhu, H., Shao, J., Shi, Y., Dai, S.,
666 Hüttermann, A., Polle, A., 2008. Ionic homeostasis and reactive oxygen species control in
667 leaves and xylem sap of two poplars subjected to NaCl stress. *Tree Physiol.* 28, 947-957.
668 <https://doi.org/10.1093/treephys/28.6.947>
669
- 670 Yang, Y.J., Chang, W., Huang, W., Zhang, S.B., Hu, H., 2017. The effects of chilling-light
671 stress on photosystems I and II in three *Paphiopedilum* species. *Bot. stud.* 58, 1-12.
672 <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0208-4>
673
- 674 Zhang, S., Scheller, H.V., 2004. Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and
675 subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1595-1602.
676 <https://doi.org/10.1093/pcp/pch180>
677
- 678 Zhao, Z., Chen, G., Zhang, C., 2001. Interaction between reactive oxygen species and nitric
679 oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Aust. J. Plant*
680 *Physiol.* 28, 1055-1061. <https://doi.org/10.1071/PP00143>

**4 ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO ESTOMÁTICA E DE TRICOMAS
GLANDULARES DE *Aloysia triphylla* SUBMETIDAS À CONDIÇÕES DE ESTRESSE
HÍDRICO E VARIAÇÃO SAZONAL**

Submetido para o periódico: Pesquisa Agropecuária Tropical.

Situação: Em avaliação.

1 Caracterização estomática e de tricomas glandulares de *Aloysia triphylla* submetidas à
2 condições de estresse hídrico e variação sazonal

3
4 4.1 RESUMO: A sazonalidade e a disponibilidade hídrica promovem alterações nas estruturas
5 anatômicas de folhas e conseqüentemente na quantidade de óleo essencial no interior dos
6 tricomas glandulares. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a densidade estomática e
7 de tricomas glandulares, bem como a morfometria de estômatos em folhas de *Aloysia triphylla*
8 submetidas à diferentes disponibilidades hídricas e à sazonalidade. O experimento foi
9 conduzido em ambiente protegido sob delineamento de blocos casualizados, esquema fatorial
10 4x4, constituído por quatro estações do ano (outono, inverno, primavera e verão) e quatro
11 disponibilidades hídrica (25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo) com quatro blocos,
12 sendo a unidade experimental composta por quatro plantas para densidade estomática e de
13 tricomas glandulares e 12 unidades experimentais para a morfometria estomática (comprimento
14 e largura do estômato e área estomática). As plantas foram submetidas a diferentes
15 disponibilidades hídricas da metade ao final de cada estação. Observou-se que a sazonalidade
16 afetou a densidade e morfometria estomática, sendo que a maior densidade estomática foi
17 encontrada durante a primavera, enquanto que a morfometria e área estomática foram
18 superiores na primavera e inverno. Foi possível observar que a densidade de tricomas
19 glandulares da epiderme abaxial da folha foi superior para as estações de inverno e verão e com
20 as menores disponibilidades hídricas. Conclui-se que na primavera ocorre maior densidade
21 estomática, enquanto que no inverno ocorre as menores densidades. A densidade de tricomas
22 glandulares aumenta nas estações de inverno e verão sob baixas disponibilidades hídricas.

23 PALAVRAS-CHAVE: Cidrô; Estômatos; Epiderme; Disponibilidade hídrica; Estações do ano.

25 Stomatal characterization and glandular trichomes of *Aloysia triphylla* submitted to water
26 stress conditions and seasonal variation

27

28 4.2 ABSTRACT: Seasonality and water availability promote changes in the anatomical
29 structures of leaves and consequently the amount of essential oil inside the glandular trichomes.
30 Therefore, the objective of this study was to evaluate the stomatal density and glandular
31 trichomes, as well as the morphometry of stomata in leaves of *Aloysia triphylla* submitted to
32 different water availability and seasonality. The experiment was conducted in a protected
33 environment under a randomized block design, 4x4 factorial scheme, consisting of four seasons
34 of the year (autumn, winter, spring and summer) and four water availability (25%, 50%, 75%
35 and 100% of the capacity with four blocks, the experimental unit being composed of four plants
36 for stomatal density and glandular trichomes and 12 experimental units for stomatal
37 morphometry (stomatal length and width and stomatal area). The plants were submitted to
38 different water availability of the half at the end of each season. It was observed that seasonality
39 affected stomatal density and morphometry, with the highest stomatal density found during
40 spring, while morphometry and stomatal area were higher in spring and winter. It was possible
41 to observe that the density of glandular trichomes of the abaxial epidermis of the leaf was
42 superior for the winter and summer seasons and with the lowest water availability. It is
43 concluded that in spring there is a greater stomatal density, whereas in winter there occurs the
44 lowest densities. The density of glandular trichomes increases in winter and summer seasons
45 under low water availability.

46 KEYWORDS: Cidró; Stomata; Epidermis; Water availability; Seasons.

47

4.3 INTRODUÇÃO

48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72

A *Aloysia triphylla* é uma planta pertencente à família Verbenaceae, conhecida popularmente como cidró, erva-luisa ou lemon verbena, que possui propriedades medicinais e aromáticas com atividades antimicrobianas, neuropsicológicas, gastrointestinais, antioxidantes, dentre outras, sendo cultivada em diversos países em função do seu elevado valor econômico (Bahramsoltani et al. 2018). Trata-se de uma planta produtora de óleo essencial, o qual é armazenado na forma líquida em tricomas glandulares presentes nas folhas e possui cheiro característico (Bakkali et al. 2008, Crabas et al. 2003). Gattuso et al. (2008) observaram que a *Aloysia citriodora* (sinonímia científica de *Aloysia triphylla*) apresenta tricomas nas duas porções da folha, porém, com maior abundância de tricomas na porção abaxial. Portanto, como o teor e a composição dos compostos voláteis são influenciadas por fatores fisiológicos, fitotécnicos e ambientais (Brandt et al. 2009, Meira et al. 2013), as estruturas secretoras destes compostos, ou seja, os tricomas glandulares, também podem ser afetados por estes fatores. Feijó et al. (2014), confirmaram em *Varronia curassavica* que o teor de óleo essencial está diretamente relacionado à densidade de tricomas glandulares. Dessa forma, entende-se que quanto maior densidade de tricomas glandulares maior será a capacidade da espécie para armazenamento de óleo essencial e, conseqüentemente, maior teor desse metabólito secundário.

Na epiderme das folhas dos vegetais também encontram-se os estômatos, que são células especializadas com a função de regular a absorção de CO₂, fundamental para a fotossíntese e no controle da perda de água através da transpiração, sendo que estes processos ocorrem ao mesmo tempo e estão diretamente interligados (Lee et al. 2016, Pociecha et al. 2016, Spinelli et al. 2016). O desenvolvimento dos estômatos é controlado por fatores ambientais, tanto pelo fornecimento de luz como também de água (Bucher et al. 2017). Portanto, as características anatômicas e a densidade estomática são importantes para a produção e também para a sobrevivência das espécies (Vatén & Bergmann 2012).

73 O estresse hídrico é um dos fatores ambientais que mais resulta em modificações no
74 funcionamento das plantas, como por exemplo, o fechamento estomático e a redução de trocas
75 gasosas, o que limita o processo fotossintético e conseqüentemente afeta todo o metabolismo
76 vegetal (Campbell et al. 2010, Hu et al. 2010). No entanto, as plantas desenvolveram
77 mecanismos de aclimação, através de modificações anatômicas e fisiológicas no intuito de
78 garantir a sobrevivência das espécies (Chaves et al. 2009, Zaharah & Razi 2009, Hamed et al.
79 2016, Santana-Vieira et al. 2016, Zhang et al. 2016). Alguns dos indicadores da aclimação
80 das espécies, quando mantidas em condições de estresse hídrico, podem ser observados pela
81 densidade e tamanho estomático (Makbul et al. 2011). Portanto, as diferentes estações do ano
82 também tendem a modificar a densidade estomática e a fim de maximizar as trocas gasosas em
83 função da plasticidade fenotípica dos vegetais.

84 No entanto, pouco se sabe sobre as modificações das células especializadas da epiderme
85 de folhas de *Aloysia triphylla* submetidas a condições de estresse hídrico e variação sazonal.
86 Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar a densidade estomática e de tricomas glandulares,
87 assim como a morfometria estomática de folhas de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes
88 disponibilidades hídricas e à sazonalidade.

89

90

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

91 O trabalho foi conduzido em ambiente protegido no período de agosto de 2015 a março
92 de 2017. Pela classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa - temperado úmido com
93 verão quente e temperaturas máximas do ar nos meses mais quentes acima de 22 °C (Alvares et
94 al. 2013).

95 As mudas de *Aloysia triphylla* foram propagadas vegetativamente pelo método da
96 miniestaquia, a partir da retirada de estacas com aproximadamente 10 cm e três gemas de
97 plantas matrizes, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (com 1% de cloro ativo)

98 durante um minuto e posterior lavagem em água destilada. As miniestacas foram plantadas em
99 espuma fenólica devidamente lavadas e com dimensões de 2x2x5 cm, utilizando-se uma célula
100 da espuma fenólica para cada miniestaca, introduzindo-se um nó no substrato e dois fora da
101 espuma. As placas de espuma fenólica foram mantidas sobre bancada com subirrigação, sendo
102 os turnos de rega controlados através de timer, com 15 minutos ligados e 60 minutos desligados.
103 No período noturno realizou-se apenas dois períodos de irrigação de 15 minutos.

104 Após 13 dias iniciou-se o fornecimento de solução nutritiva conforme indicação de
105 Furlani (2009), na concentração de 25%. A condutividade elétrica e o pH da solução foram
106 mantidas em, aproximadamente, 300 μ S e 6,0, respectivamente. Após 68 dias, as miniestacas
107 foram transplantadas para vasos de cinco litros contendo substrato comercial, para completar a
108 formação das mudas.

109 Para a condução do experimento, mudas com 152 dias foram transplantadas para vasos
110 de capacidade de 14,3 litros, preenchidos com uma fina camada de brita (3 kg) + mistura de
111 solo peneirado e 10% de esterco bovino curtido. Para evitar perda excessiva de água pelo
112 processo de evapotranspiração, os vasos foram pintados com tinta branca na parte exterior e
113 adicionados bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 100 g em cada vaso, com o intuito de
114 formar a cobertura sobre o solo.

115 O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em esquema
116 fatorial 4x4, sendo quatro estações do ano (fator sazonalidade) e quatro níveis de
117 disponibilidades hídricas (fator disponibilidade hídrica), com quatro repetições. Os quatro
118 níveis de disponibilidade hídrica avaliados foram 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de
119 campo durante o cultivo nas quatro estações do ano, sendo no outono, inverno, primavera e
120 verão. A unidade experimental foi composta por quatro plantas para densidade estomática e de
121 tricomas glandulares. Para a morfometria estomática foram utilizadas quatro repetições de três
122 estômatos cada, totalizando 12 unidades experimentais por repetição.

123 Todas as plantas foram irrigadas com 100% da capacidade de campo até o início da
124 restrição hídrica, aos 45 dias antes da coleta das folhas para avaliação, ou seja, a partir do
125 período que corresponde à metade de cada estação. O manejo hídrico foi baseado na umidade
126 do vaso com solo, determinado pelo método de pesagem, a partir da pesagem diária dos vasos,
127 com auxílio de balança digital (de capacidade máxima de 40 kg). A reposição da água
128 evapotranspirada foi realizada sempre que a variação entre a massa inicial do vaso e a massa
129 obtida no dia da avaliação tornava-se igual ou superior a 2%. Assim sendo, a diferença entre as
130 massas correspondia à quantidade de água a ser completada, adotando-se que a água apresenta
131 relação massa/volume 1:1.

132 Ao final de cada estação foram avaliadas densidade estomática e de tricomas
133 glandulares da epiderme abaxial e adaxial das folhas, além da morfometria dos estômatos. Para
134 estas avaliações foram retiradas as folhas presentes no quinto nó do ápice em direção à base da
135 planta. Foram confeccionadas lâminas semipermanentes a partir da impressão da epiderme
136 abaxial e adaxial da folha, com o uso de adesivo de éster de cianoacrilato, técnica conhecida
137 como *imprints* (Weyers & Johansen 1985, Campos et al. 2009). A folha foi pressionada
138 aproximadamente 30 segundos sobre a gota de adesivo na lâmina, possibilitando a permanência
139 da impressão da epiderme. As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico com câmera
140 fotográfica acoplada, sendo as imagens fotomicrografadas com auxílio de *software* apropriado.
141 Os estômatos e tricomas glandulares foram contabilizados através do *software* de análises
142 quantitativas para estudos de anatomia vegetal “Anati Quanti”. A densidade estomática e de
143 tricomas glandulares por mm² da folha foram calculadas em função da área da foto
144 disponibilizada pelo software, sendo de 298 x 223 µm, para o aumento de 40 vezes.

145 As mesmas imagens utilizadas para a contagem estomática e de tricomas glandulares,
146 foram utilizadas para a realização da morfometria estomática, ou seja, medição dos estômatos.
147 As medições foram realizadas com o auxílio do *software* “ImageJ” e expressas em µm. Em

148 relação a morfometria foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento e largura dos
149 estômatos (célula guarda mais ostíolo) e área estomática. A área estomática foi determinada
150 através da multiplicação do comprimento e largura do estômato (Eq. 1):

$$151 \quad \text{Área estomática } (\mu\text{m}^2) = \text{comprimento } (\mu\text{m}) * \text{largura } (\mu\text{m}) \quad (\text{Eq. 1})$$

152 Os dados foram submetidos à análise de variância para avaliar o efeito da sazonalidade
153 e os diferentes níveis de disponibilidade hídrica e, quando significativos, realizou-se análise de
154 regressão para dados quantitativos e comparação de médias para dados qualitativos, pelo teste
155 de Scott e Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Genes (Cruz 2013).

156

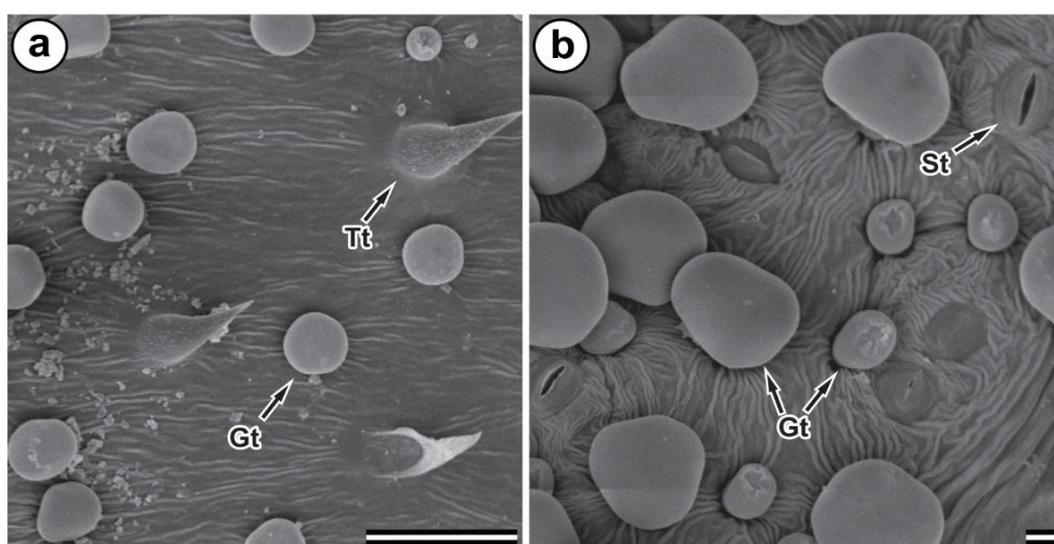
157 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

158 Pela análise de variância, foi possível observar que a densidade estomática da epiderme
159 abaxial e a morfometria estomática (largura e área estomática) apresentaram diferença
160 significativa apenas para o fator sazonalidade, pelo teste F ($p < 0,05$). A variável comprimento do
161 estômato não apresentou diferença significativa para os fatores estudados. A densidade de
162 tricomas glandulares da epiderme abaxial e adaxial da folha foram significativas para a interação
163 entre os fatores sazonalidade x disponibilidade hídrica, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

164 Os resultados demonstraram que o fator sazonalidade afeta a densidade estomática e o
165 tamanho dos estômatos, sendo que a primavera proporcionou maior densidade estomática,
166 assim como a formação de estômatos com maior tamanho nas folhas. Os tricomas glandulares
167 das porções abaxial e adaxial foram influenciados pela interação dos fatores sazonalidade e
168 disponibilidade hídrica, com diferentes respostas diante destas condições.

169 A *Aloysia triphylla* apresenta distribuição dos estômatos em apenas uma das epidermes
170 da folha, sendo do tipo hipoestomática (Figura 1). Esta característica está relacionada ao fator
171 de adaptação da espécie diante de fatores ambientais como elevada radiação e temperatura e
172 baixa disponibilidade hídrica, já que o gênero *Aloysia* também é cultivado no norte da África

173 (Carnat et al. 1999), ambiente este com clima característico de subtropical com verão quente.
174 Além disso, os estômatos possuem formato reniforme, envolvido por um número variável de
175 células epidérmicas que não diferem quanto ao formato e tamanho, caracterizando-o como
176 anomocítico e com presença de estrias ao redor dos estômatos (Gattuso et al. 2008). Essas
177 características foram confirmadas no presente estudo em fotos das epidermes adaxial e abaxial
178 da folha de *Aloysia triphylla* a partir de microscopia eletrônica de varredura (Figura 1).
179

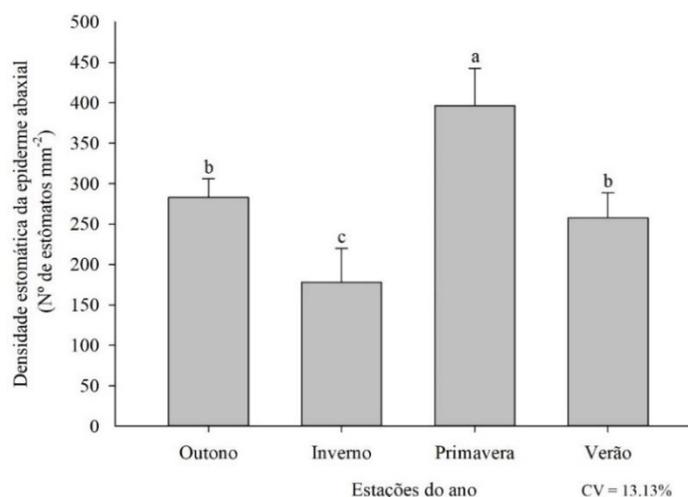


180
181 Figura 1. Detalhes dos estômatos e tricomas da epiderme adaxial (a) e abaxial (b) de folhas de
182 *Aloysia triphylla* a partir de microscopia eletrônica de varredura. Tt: Tricoma tector; Gt:
183 Tricoma glandular; St: Estômato. Barra em a: 100 μm ; Barra em b: 10 μm .
184

185 Os estômatos são células epidérmicas especializadas responsáveis por controlar as trocas
186 gasosas da planta, ou seja, a perda de água na forma de vapor para a atmosfera pelo processo de
187 transpiração, como também a entrada de CO_2 para o interior da folha, no processo fotossintético
188 (Wang et al. 2016). Estas trocas gasosas são reguladas basicamente pelas células-guarda, que
189 ajustam rapidamente a abertura do poro estomático em resposta às variações ambientais,
190 promovendo equilíbrio entre perda de água e absorção de CO_2 (Chaves et al. 2011), o que

191 demonstra que a densidade estomática apresenta plasticidade quanto a sazonalidade. Para a
192 densidade estomática da epiderme abaxial da folha, observou-se superioridade significativa na
193 estação da primavera (397 estômatos mm^{-2}) quando comparado às demais estações. A menor
194 densidade estomática foi encontrada durante o cultivo de inverno, com aproximadamente 178
195 estômatos mm^{-2} (Figura 2).

196



197

198 Figura 2. Densidade estomática da epiderme abaxial de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo
199 em diferentes estações do ano. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre estações do
200 ano não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade

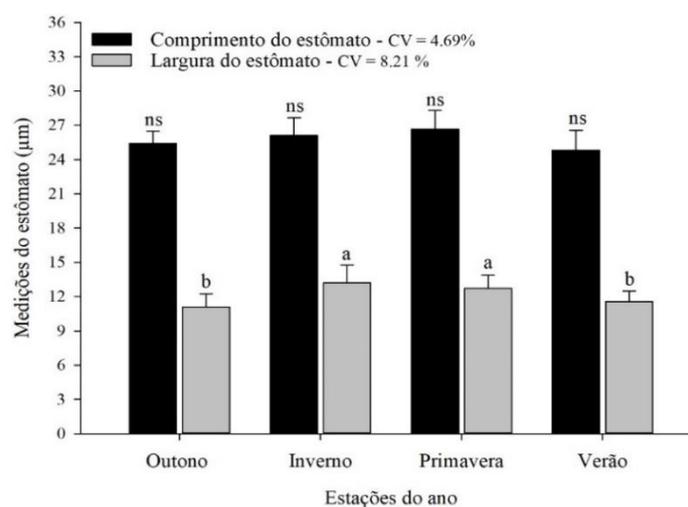
201

202 Durante a primavera, houve condições ambientais mais favoráveis no sentido de
203 promover o aumento da densidade estomática, permitindo maiores trocas gasosas com o
204 ambiente e a produção de fotoassimilados. Castro et al. (2009) confirmam que o incremento da
205 densidade estomática está relacionado com a maior capacidade que as plantas têm em absorver
206 CO_2 da atmosfera, a fim de aumentar a capacidade fotossintética. A maior densidade estomática
207 encontrada na primavera também pode ser justificada em função da *Aloysia triphylla* apresentar
208 maior crescimento em outubro e atingindo máximo crescimento durante o verão (Brandt et al.
209 2008). Com isso, os estômatos são fundamentais na promoção das trocas gasosas, sendo que

210 elevada densidade estomática tende a evitar que a fotossíntese seja limitada, tornando-se um
 211 importante parâmetro para avaliar a capacidade de aclimatação das plantas em diferentes
 212 condições ambientais (Vráblová et al. 2018). No entanto, por se tratar de uma espécie de clima
 213 tropical e subtropical, pode ocorrer a perda de folhas nos períodos mais frios do ano (Paulus et
 214 al. 2013). Isso demonstra que a menor densidade estomática no inverno, pode estar relacionada
 215 à condição ambiental pouco favorável para o crescimento, visto que nos períodos mais frios as
 216 plantas reduzem o metabolismo e entram em dormência.

217 Geralmente, maior densidade estomática está relacionada com a ocorrência de estômatos
 218 de menor tamanho, possibilitando trocas gasosas e melhorando a condutância estomática foliar
 219 (Laza et al. 2010). O tamanho dos estômatos, representa basicamente o tamanho das células-
 220 guarda, sendo que a condutância estomática é caracterizada em função do tamanho e da forma
 221 do estômato (Schmidt et al. 2017). Com isso, para a morfometria estomática, a variável largura
 222 do estômato foi significativamente superior nas estações de inverno e primavera quando
 223 comparadas às demais (13,2 e 12,7 μm , respectivamente) (Figura 3).

224



225

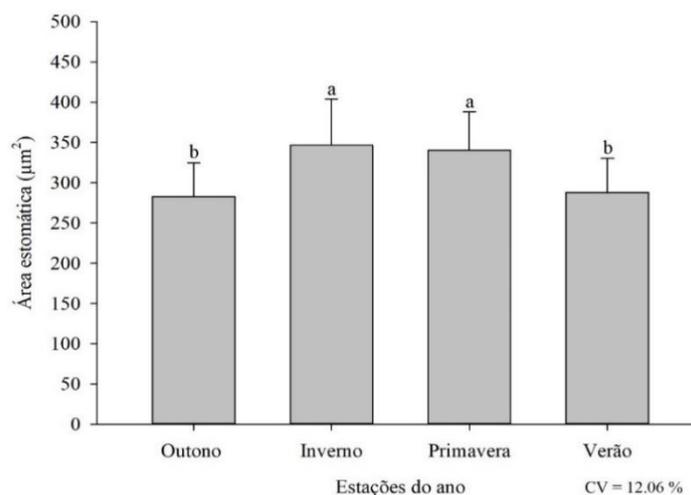
226 Figura 3. Comprimento e largura dos estômatos de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo em
 227 diferentes estações do ano. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre estações do ano
 228 não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

229 A presença de elevada densidade de estômatos pequenos tende a minimizar a perda de
230 água por transpiração e promover entrada de carbono para atividade fotossintética, pois quanto
231 menor o tamanho do estômato, mais rapidamente ocorre o processo de abertura e fechamento do
232 ostíolo (Drake et al. 2013, Schmidt et al. 2017). Além disso, a redução no tamanho dos estômatos
233 tende a promover maior resistência à passagem da molécula de água para o processo de
234 transpiração, enquanto a molécula de CO₂ é capturada normalmente em função de apresentar
235 menor tamanho e resistência de difusão (Fermino Jr. & Fockink 2017). No presente trabalho, a
236 maior quantidade de estômatos de menor tamanho encontrados nas estações de outono e verão,
237 podem estar relacionados ao mecanismo de aclimação das plantas, principalmente ao fator
238 temperatura.

239 Em contrapartida, a estação de inverno apresentou a menor densidade estomática, no
240 entanto, com maior largura do estômato. Isso demonstra que esta estação ocorreu menor
241 formação de estômatos, no entanto, com maior tamanho. A primavera não diferiu do inverno
242 para a variável largura do estômato, destacando-se como estação favorável ao crescimento e
243 desenvolvimento das plantas, uma vez que além de apresentar elevada densidade estomática,
244 também se caracteriza por apresentar estômatos de maior tamanho. A densidade estomática
245 apresenta maior plasticidade, quando comparada ao comprimento e abertura do estômato
246 (Richardson et al. 2001), com isso, as plantas aclimatam-se de acordo com as mudanças
247 ambientais.

248 A área estomática apresentou resultado semelhante à largura do estômato, sendo que
249 nas estações do inverno e primavera foram significativamente superiores, com áreas de 346 e
250 340 μm^2 , respectivamente (Figura 4).

251



252

253 Figura 4. Área estomática de folhas de *Aloysia triphylla* sob cultivo em diferentes estações do

254 ano. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre estações do ano não diferem entre si

255 pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

256

257 Portanto, as plantas possuem capacidade de ajustar as características morfológicas dos

258 estômatos, incluindo a morfometria e a densidade, em função da variação das condições

259 ambientais (Pearce et al. 2006). A sazonalidade altera as condições ambientais durante o ano

260 (temperatura, radiação solar, fotoperíodo, dentre outras), sendo que no presente estudo, esse

261 efeito foi o fator que influenciou nas características de densidade e morfometria estomática. A

262 diferenciação celular permite modificações de características morfológicas, atuando como um

263 mecanismo de defesa das plantas contra agentes estressantes (Potters et al. 2007).

264 As disponibilidades hídricas, com ou sem estresse, não influenciaram a densidade e

265 morfometria estomática. Resultados contraditórios foram encontrados por Wang et al. (2016),

266 em estudo avaliando a densidade e tamanho de estômatos em folhas de trigo (*Triticum aestivum*)

267 sob estresse hídrico, no qual observaram maiores densidades estomáticas e menores

268 comprimentos e largura dos estômatos em plantas bem irrigadas durante todos os estádios de

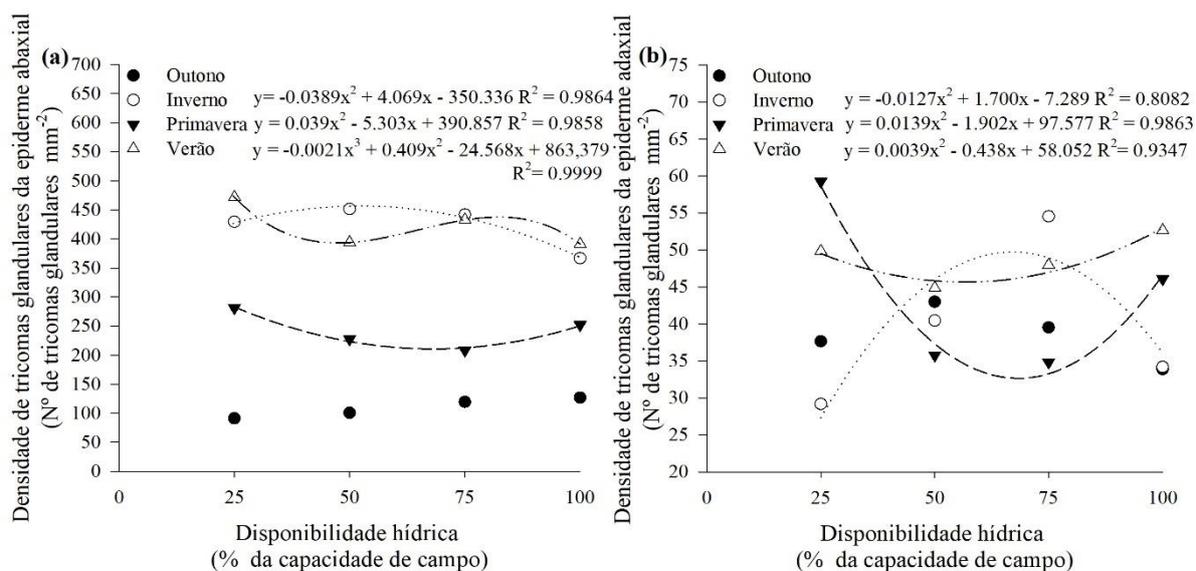
269 crescimento. No presente trabalho, provavelmente, as diferentes disponibilidades hídricas não

270 afetaram a densidade e morfometria estomática em função da restrição hídrica iniciar na metade
271 de cada estação, onde os estômatos estavam diferenciados nas folhas.

272 Os tricomas glandulares estão presentes em ambas as epidermes da folha (abaxial e
273 adaxial), porém, com maior quantidade deste tipo de células especializadas na epiderme
274 abaxial. Para a densidade de tricomas glandulares houve variações quanto à sazonalidade e as
275 disponibilidades hídricas em que as plantas foram submetidas. Os tricomas glandulares são
276 apêndices epidérmicos que desempenham importantes funções nas plantas, pois além de
277 armazenar metabólitos secundários, estão relacionados à mecanismos de defesa das plantas
278 contra fatores bióticos e também atuam como uma barreira física protegendo as plantas contra
279 fatores de estresse abiótico (Cui et al. 2011, Stratmann & Bequette 2016).

280 A epiderme abaxial da folha apresentou elevada densidade de tricomas glandulares, com
281 diferenças na presença destas estruturas especializadas dependendo da estação do ano (Figura
282 5a). A maior densidade de tricomas glandulares foram observadas nas estações do inverno e
283 verão, com médias de 366 a 471 tricomas glandulares mm^{-2} , respectivamente. Para o outono,
284 verificou-se a menor densidade (média de 109 tricomas glandulares mm^{-2}), não sendo
285 encontrada nenhuma equação significativa, demonstrando assim que não ocorreu diferença
286 significativa entre as disponibilidades hídricas para esta estação. Para o inverno, a curva que
287 melhor se ajustou foi a quadrática, sendo que a condição de 100% da capacidade de campo
288 apresentou menor densidade (366 tricomas glandulares mm^{-2}). A estação de primavera também
289 se ajustou de forma quadrática, com maior densidade de tricomas glandulares nas
290 disponibilidades hídricas extremas, ou seja, 25% e 100% da capacidade de campo. Para o verão,
291 a curva que melhor se ajustou foi a cúbica, em função da disponibilidade hídrica, com maior
292 densidade de tricomas glandulares para as disponibilidades hídricas de 25% e 75% da
293 capacidade de campo (Figura 5a).

294



295

296 Figura 5. Densidade de tricomas glandulares da epiderme abaxial (a) e adaxial (b) de folhas de

297 *Aloysia triphylla* sob diferentes disponibilidades hídricas durante as estações do ano.

298

299 Os fatores abióticos, como o efeito da sazonalidade e disponibilidade hídrica,

300 influenciam sobre a quantidade e qualidade dos componentes dos metabólitos, assim como nas

301 características e modificações morfofisiológicas das plantas, em que células epidérmicas são

302 induzidas a se diferenciar em estômatos ou tricomas, diante das condições de estresse (Bartoli

303 et al. 2014). Assim sendo, a maior densidade de tricomas glandulares pode indicar condições

304 de estresse abiótico ou biótico em que as plantas estão submetidas, sendo que o cultivo de

305 *Aloysia triphylla* durante as estações de inverno e verão com baixa disponibilidade hídrica,

306 indicam uma condição desfavorável para as plantas. Normalmente, estas estações apresentam

307 condições extremas de temperatura e radiação. Em função disso, a presença de maior

308 quantidade de tricomas glandulares nas folhas fornece proteção à planta, tanto contra o excesso

309 de calor como de frio. Além disso, a maior ocorrência de tricomas glandulares também está

310 relacionada à maior produção de óleo essencial que geralmente ocorre em condições de estresse,

311 sendo que esse metabólito secundário precisa ser armazenado nos tricomas glandulares. Maffei

312 (2010) confirma que a produção de metabólitos secundários de plantas aromáticas,

313 principalmente terpenóides, são armazenados em tricomas glandulares e servem como
314 estratégia de defesa das plantas.

315 A epiderme adaxial das folhas apresentou menor densidade de tricomas glandulares
316 quando comparados à epiderme abaxial, pois a maior média observada nesta porção foi de 59
317 tricomas mm^{-2} na estação da primavera em disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de
318 campo (Figura 5b). A estação de outono, assim como na epiderme abaxial, não apresentou
319 nenhuma equação significativa. Para a estação do verão, a curva que melhor se ajustou foi a
320 quadrática, e as menores densidades foram encontradas na disponibilidade hídrica de 50% da
321 capacidade de campo. No inverno, a linha de tendência que melhor se ajustou foi a quadrática,
322 com maior densidade de tricomas glandulares na disponibilidade hídrica de 75% da capacidade
323 de campo (55 tricomas glandulares mm^{-2}). A primavera também apresentou resposta quadrática,
324 porém a densidade de tricomas glandulares foi significativamente superior com 25% da
325 capacidade de campo (Figura 5b).

326 Em condições de alta temperatura ou baixa disponibilidade hídrica, os tricomas
327 promovem redução da temperatura foliar, favorecendo a manutenção da assimilação de CO_2 e
328 conseqüentemente a aclimação das plantas àquelas condições (Ehleringer & Mooney 1978).
329 Este fato pode explicar a maior ocorrência de tricomas glandulares nas folhas durante as estações
330 com temperaturas mais elevadas, como a primavera e verão. Porém, durante estas estações,
331 observou-se que em baixa disponibilidade hídrica (e alta no verão) houve a maior quantidade de
332 tricomas glandulares, o que comprova um mecanismo de aclimação das plantas para tolerar as
333 condições desfavoráveis de ambiente, como sazonalidade e disponibilidade hídrica.

334

335

4.6 CONCLUSÃO

336 Conclui-se que na estação da primavera ocorre a maior densidade estomática. No
337 inverno e primavera os estômatos apresentam maior largura e, conseqüentemente maior área

338 estomática. E nas estações de inverno e verão, sob baixas disponibilidades hídricas ocorre
339 aumento da densidade de tricomas glandulares.

340

341 4.7 REFERÊNCIAS

342 ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische*
343 *Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

344

345 BAHRAMSOLTANI, R. et al. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): a review of
346 phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, v. 222, n.1 p. 34-51, 2018.

347

348 BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical*
349 *Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

350

351 BARTOLI, G. et al. Plant adaptation to extreme environments: The example of *Cistus*
352 *salviifolius* of an active geothermal alteration field. *Comptes Rendus Biologies*, v. 337, n. 2, p.
353 101-110, 2014.

354

355 BRANT, R. S. et al. Teor do óleo essencial de cidrão (*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton) em
356 função da variação sazonal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 10, n. 2, p. 83-88,
357 2008.

358

359 BRANT, R. S. et al. Teores do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton
360 (Verbenaceae)] em diferentes horários de colheita e processamentos pós-colheita. *Ciência e*
361 *Agrotecnologia*, v. 33, n. Edição Especial, p. 2065-2068, 2009.

362

363 BUCHER, S. F. et al. Stomatal traits relate to habitat preferences of herbaceous species in a
364 temperate climate. *Flora*, v. 229, n. 1, p. 107-115, 2017.

365

366 CAMPBELL, D. R. et al. Photosynthetic and growth responses of reciprocal hybrids to
367 variation in water and nitrogen availability. *American Journal of Botany*, v. 97, n. 6, p. 925-
368 93, 2010.

369

370 CAMPOS, M. L. et al. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation
371 of anti-herbivory traits in tomato. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 15, p. 4347-
372 4361, 2009.

373

- 374 CARNAT, A. et al. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea.
375 *Fitoterapia*, v. 70, n. 1, p. 44-49, 1999.
376
- 377 CASTRO E. M. et al. *Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras:
378 UFLA, 2009.
379
- 380 CHAVES, M. M. et al. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms
381 from whole plant to cell. *Annals of Botany*, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.
382
- 383 CHAVES, M. M. et al. Recent advances in photosynthesis under drought and salinity.
384 *Advances in Botanical Research*, v. 57, n. 1, p. 49-104, 2011.
385
- 386 CRABAS, N. et al. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula*
387 *officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by supercritical CO₂. *Journal of Essential*
388 *Oil Research*, v. 15, n. 4, p. 272-277, 2003.
389
- 390 CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and
391 quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
392
- 393 CUI, H. et al. Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. *Biomed Central*
394 *plant biology*, v. 76, n. 11, p. 1-10, 2011.
395
- 396 DRAKE, P. L. et al. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and
397 stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 495-505, 2013.
398
- 399 EHLERINGER, J. R.; MOONEY, H. A. Leaf hairs: effect on physiological activity and
400 adaptative value to a desert shrub. *Oecologia*, v. 37, n. 2, p. 183-200, 1978.
401
- 402 FEIJÓ, E. V. D. S. et al. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing
403 trichomes frequency. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 5, p. 516-523, 2014.
404
- 405 FERMINO JR, P. C. P.; FOCKINK, G. D. Leaf anatomy of young plants of erva-mate (*Ilex*
406 *paraguariensis* A. St. Hill.) under different shading levels. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.
407 16, n. 3, p. 335-341, 2017.
408
- 409 FURLANI, P. R. *Cultivo de frutas e hortaliças em ambiente protegido*. Fortaleza: Instituto
410 Frutal, 2009.
411

- 412 GATTUSO, S. et al. Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization
413 of lemon verbena (*Aloysia citriodora* palau) from Argentina. *Boletín Latinoamericano y del*
414 *Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 7, n. 4, p. 190-198, 2008.
415
- 416 HAMED, S. B. et al. Physiological responses of *Pistacia vera* L. versus *Pistacia*
417 *atlantica* Desf. to water stress conditions under arid bioclimate in Tunisia. *Scientia*
418 *Horticulturae*, v. 203, n. 1, p. 224-230, 2016.
419
- 420 HU, L. et al. Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and
421 recovery of photosynthesis from drought stress in a C3 perennial grass species. *Physiologia*
422 *Plantarum*, v. 139, n. 1, p. 93-106, 2010.
423
- 424 LAZA, M. R. C. et al. Quantitative trait loci for stomatal density and size in lowland rice.
425 *Euphytica*, v. 172, n. 2, 149-158, 2010.
426
- 427 LEE, H. et al. Carbon and hydrogen isotopic effects of stomatal density in *Arabidopsis*
428 *thaliana*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 179, n. 1, p. 275-286, 2016.
429
- 430 MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South*
431 *African Journal of Botany*, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.
432
- 433 MAKBUL, S. et al. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under
434 drought stress. *Turkish Journal of Botany*, v. 35, n. 4, p. 369-377, 2011.
435
- 436 MEIRA, M. R. et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de
437 *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. *Ciência Rural*, v. 43, n. 5, p. 779-
438 785, 2013.
439
- 440 PAULUS, D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da
441 sazonalidade e horário de colheita. *Horticultura Brasileira*, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.
442
- 443 PEARCE D. W. et al. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid
444 environment. *Tree Physiology*, v. 26, n. 2, p. 211-218, 2006.
445
- 446 POCIECHA, E. et al. Mechanisms involved in the regulation of photosynthetic efficiency and
447 carbohydrate partitioning in response to low- and high-temperature flooding triggered in
448 winter rye (*Secale cereale*) lines with distinct pink snow mold resistances. *Plant Physiology*
449 *and Biochemistry*, v. 104, n. 1, p. 45-53, 2016.
450

- 451 POTTERS, G. et al. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends*
452 *in Plant Science*, v. 12, n. 3, p. 98-105, 2007.
453
- 454 RICHARDSON, A. D. et al. Within-crown foliar plasticity of western hemlock, *Tsuga*
455 *heterophylla*, in relation to stand age. *Annals of Botany*, v. 88, n. 6, p. 1007-1015, 2001.
456
- 457 SANTANA-VIEIRA, D. D. S. et al. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to
458 drought. *Scientific reports*, v. 6, n. 38775, p. 1-12, 2016.
459
- 460 SCHMIDT, D. et al. Morfoanatomia foliar de azevém no sub-bosque de espécies arbóreas em
461 sistemas agroflorestais. *Revista Ceres*, v. 64, n. 4, p. 368-375, 2017.
462
- 463 SPINELLI, G. M. et al. Water stress causes stomatal closure but does not reduce canopy
464 evapotranspiration in almond. *Agricultural Water Management*, v. 168, n. 1, p. 11-22, 2016.
465
- 466 STRATMANN, J. W.; BEQUETTE, C. J. Hairless but no longer clueless: understanding
467 glandular trichome development. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 18, p. 5285-5287,
468 2016.
469
- 470 VATÉN, A.; BERGMANN, D. C. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary
471 view. *EvoDevo*, v. 3, n. 11, p. 1-9, 2012.
472
- 473 VRÁBLOVÁ, M. et al. Light intensity-regulated stomatal development in three generations
474 of *Lepidium sativum*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 156, n. 1, p. 316-324, 2018.
475
- 476 WANG, S. G. et al. Mapping QTLs for stomatal density and size under drought stress in wheat
477 (*Triticum aestivum* L.). *Journal of integrative agriculture*, v. 15, n. 9, p. 1955-1967, 2016.
478
- 479 WEYERS, J. D. B.; JOHANSEN, L. G. Accurate estimation of stomatal aperture from
480 silicone-rubber impressions. *New Phytologist*, v. 101, n. 1, p. 109-115, 1985.
481
- 482 ZAHARAH, S. S.; RAZI, I. M. Growth, stomata aperture, biochemical changes and branch
483 anatomy in mango (*Mangifera indica*) cv. Chokanan in response to root restriction and water
484 stress. *Scientia Horticulturae*, v. 123, n. 1, p. 58-67, 2009.
485
- 486 ZHANG, W. et al. Divergent Adaptive Strategies by Two Co-occurring Epiphytic Orchids to
487 Water Stress: Escape or Avoidance? *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. 588, p. 1-11, 2016.

5 ARTIGO 3 – RENDIMENTO, TEOR E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia triphylla* EM FUNÇÃO DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA E SAZONALIDADE

Formatado para o periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

Rendimento, teor e caracterização química do óleo essencial de *Aloysia triphylla* em função da disponibilidade hídrica e sazonalidade

5.1 RESUMO: A produção e o acúmulo de metabólitos secundários de plantas aromáticas são influenciados por diversos fatores ambientais. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o rendimento, teor e composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes disponibilidades hídrica e à sazonalidade. O experimento foi conduzido em ambiente protegido na Universidade Federal de Santa Maria, *Campus Frederico Westphalen*, em delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com quatro blocos de quatro plantas. Foram testadas quatro disponibilidades hídricas, sendo 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo durante as estações de outono, inverno, primavera e verão. Ao final de cada estação foram avaliados o rendimento, teor e composição química do óleo essencial presentes nas folhas da espécie. Observou-se que o teor de óleo essencial foi superior no inverno com baixa disponibilidade hídrica, enquanto maior rendimento se obteve na primavera com as maiores disponibilidades hídricas. A composição química do óleo foi afetada em função dos diferentes tratamentos, sendo que na estação de verão houve maior quantidade de constituintes. Conclui-se que o cultivo no inverno com baixa disponibilidade hídrica aumenta a concentração de citral. Na primavera em todas as disponibilidades hídricas e no verão com 50%, 75% e 100% da capacidade de campo aumentam a concentração de limoneno. As condições meteorológicas do verão associadas com disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de campo aumentam a concentração de óxido de cariofileno e espatulenol.

Palavras chave: Cidró, estação do ano, citral, plantas aromáticas.

5.2 ABSTRACT: Yield, content and characterization composition of *Aloysia triphylla* essential oil due to water availability and seasonality. The production and accumulation of secondary metabolites of aromatic plants are influenced by several environmental factors. The objective of this study was to evaluate the yield, content and chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* submitted to different water availability and seasonality. The experiment was conducted in a protected environment at the Federal University of Santa Maria, Frederico Westphalen *Campus*, in a randomized complete block design, in a 4x4 factorial scheme, with four blocks of four plants. Four water supplies were tested, being 25%, 50%, 75% and 100% of the field capacity during the autumn, winter, spring and summer seasons. At the end of each season the yield, content and chemical composition of the essential oil present in the leaves of the species were evaluated. It was observed that the essential oil content was higher in winter with low water availability, while higher yield was obtained in the spring with the greatest water availability. The chemical composition of the oil was affected as a function of the different treatments, and the summer had a greater amount of constituents. It was concluded that winter cultivation with low water availability increases citral concentration. In the spring in all water supplies and in summer with 50%, 75% and 100% of field capacity increase the concentration of limonene. Summer weather conditions associated with water availability of 25% of the field capacity increase the concentration of caryophyllene oxide and spatulenol.

Keywords: Cidró, season, citral, aromatic plants.

5.3 INTRODUÇÃO

A *Aloysia triphylla* L. é uma erva adstringente, com propriedades aromáticas e rica em óleo volátil, que age como sedativo brando. Seu componente químico de maior interesse é o citral, substância que confere grande importância às indústrias farmacêuticas e cosméticas (Rojas et al., 2012). Outros constituintes importantes do óleo essencial são limoneno, citronelol, geraniol, alfa e beta pineno, entre outros (Lorenzi & Matos, 2008). Além disso, o óleo essencial com seus constituintes ativos, apresentam comprovadas propriedades anestésicas, antibacterianas e atividades antioxidantes (Parodi et al., 2013; Gressler et al., 2014; Parodi et al., 2014).

Os metabólitos secundários apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e diferentes atividades biológicas e geralmente estão presentes em baixas concentrações nas plantas (Morais, 2012). Os óleos essenciais são metabólitos secundários que se caracterizam por apresentar aparência líqüida oleosa, odor característico, volatilidade e solubilidade limitada em água (Asbahani et al., 2015). Esses metabólitos geralmente estão associados à funções ecológicas na planta, empregado como mecanismo de defesa contra agentes externos como pragas e doenças. No entanto, também desempenham função de proteção contra estresses abióticos, modificando o teor e a composição química dos compostos voláteis em função de fatores fisiológicos, fitotécnicos e ambientais, podendo-se destacar temperatura, radiação solar, disponibilidade hídrica, nutrientes, umidade relativa do ar e sazonalidade (Botrel et al., 2010; Brandt et al., 2009; Meira et al., 2013). Portanto, os fatores ambientais, como estresse hídrico, afetam o metabolismo das plantas e por consequência alteram o rendimento e a composição química dos óleos essenciais produzidos pelas plantas aromáticas (Petropoulos et al., 2008; Ghassemi-Golezani et al., 2018).

A disponibilidade hídrica é um dos fatores ambientais que mais exerce influência sobre a produção agrícola e, contudo, pode influenciar a produção de óleo essencial. Em

condições de baixa disponibilidade de água no solo, vários processos metabólicos nas plantas são influenciados, como o fechamento estomático e o acúmulo de solutos e antioxidantes, resultando em maior concentração de metabólitos secundários, além da expressão de genes específicos de estresse (Meira et al., 2013). Por outro lado, plantas sob alta disponibilidade hídrica podem compensar o baixo teor de princípios ativos com maior produção de biomassa, o que resulta em maior rendimento final de princípios ativos por unidade de área (Meira et al., 2013). No entanto, a deficiência hídrica tem se apresentado como forma de manejo para proporcionar maior acúmulo de componentes de interesse de espécies medicinais e aromáticas (Pravuschi et al., 2010).

O efeito da sazonalidade também provoca alterações na composição química e no teor do óleo essencial de plantas aromáticas, porque os constituintes ativos variam durante o ano em função das características de cada estação (Morais, 2009; Paulus et al., 2013). O que se deseja no momento de colheita das plantas aromáticas é que elas alcancem elevada produção de fitomassa associada com a presença de alto teor de óleo essencial ou determinado componente químico (Bezerra et al., 2008). Porém, muitas vezes a época de maior produção de óleo essencial pode não coincidir com a mesma época de produção de algum componente de interesse do óleo essencial ou de maior produção de fitomassa das plantas (Silva, 2005).

Vários trabalhos demonstram que os constituintes ativos do óleo essencial de plantas aromáticas apresentam variações durante o ano. Por exemplo, Silva et al. (2006) obtiveram em erva-cidreira, maior teor de óleo essencial no verão e maior teor dos componentes principais durante o inverno, demonstrando que existe variações entre as estações do ano. Variações no rendimento e/ou na composição química do óleo essencial em função das estações do ano também foram observados em *Ocimum gratissimum*, *Nectandra megapotamica*, *Hesperozygis ringens* e *Aloysia triphylla* (Amaral et al., 2015; Freire et al., 2006; Pinheiro et al., 2016; Schwerz et al., 2015). Porém, diante da carência de informações

sobre o desempenho da *Aloysia triphylla* em resposta à determinados fatores ambientais, o presente estudo teve como objetivo avaliar o teor, rendimento e a composição química do óleo essencial de folhas de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes disponibilidades hídricas e à sazonalidade.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em ambiente protegido, na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus Frederico Westphalen*, situado a 27° 23' S, 53° 25' O e 493 m de altitude, no período de agosto de 2015 a março de 2017. Pela classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa - temperado úmido com verão quente, com temperaturas máximas do ar nos meses mais quentes maiores que 22 °C (Alvares et al., 2013).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com quatro blocos, sendo cada bloco composto por quatro plantas. Os quatro níveis de disponibilidade hídrica testadas foram 25%, 50%, 75% e 100% da capacidade de campo durante o cultivo nas estações de outono, inverno, primavera e verão. No entanto, para a caracterização da composição química utilizou-se esquema fatorial 4x3, sendo as mesmas disponibilidades hídricas, porém, sem a estação de outono.

As mudas de *Aloysia triphylla* foram propagadas vegetativamente pelo método da miniestaquia e mantidas sobre bancada com subirrigação constante, na forma de lâmina de água, sendo os turnos de rega controlados por temporizador, com 15 minutos ligados e 60 minutos desligados. Após 13 dias de irrigação, foi acrescida a água 25% de solução nutritiva indicada por Furlani (2009). Após 68 dias, as miniestacas foram transplantadas para vasos de cinco litros contendo substrato comercial, para a perfeita formação das mudas, durante mais 84 dias.

Para a condução do experimento, mudas de 152 dias foram transplantadas para vasos de capacidade de 14,3 litros, preenchidos com uma fina camada de brita (3 kg) e uma mistura solo peneirado + 10% de esterco bovino curtido). Para evitar perda excessiva de água pelo processo de evaporação, foram adicionados bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 100 gramas em cada vaso, com a finalidade de formar uma cobertura sobre o solo. Para promover a maior reflexão e menor absorção da radiação solar, os vasos foram pintados de branco na parte exterior, para evitar o superaquecimento e a perda excessiva de água pelo processo de evaporação do solo.

A restrição hídrica iniciou aos 45 dias antes da coleta das folhas para avaliação, ou seja, a partir do período que corresponde à metade de cada estação. Antes do início da restrição hídrica, todas as plantas foram irrigadas com 100% da capacidade de campo. O manejo hídrico foi baseado na umidade do vaso com solo, determinado pelo método de pesagem, através da pesagem diária dos vasos, com auxílio de balança digital com capacidade máxima de 40 kg. A reposição da água evapotranspirada foi realizada sempre que a variação entre a massa inicial do vaso e a massa obtida no dia da avaliação tornava-se igual ou superior a 2%. Assim sendo, a diferença entre as massas correspondia à quantidade de água a ser completada, assumindo que a água apresenta relação massa/volume 1:1.

Ao final de cada estação, o óleo essencial foi extraído de folhas frescas por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger modificado durante 3 horas após o início da fervura. Para a extração, foram utilizadas amostras compostas, em que a massa fresca de folhas variou de acordo com a disponibilidade de folhas, em função das diferentes disponibilidades hídricas e da sazonalidade que as plantas estavam expostas. Para isso, foi necessário juntar duas repetições para cada tratamento, totalizando aproximadamente oito plantas e colhidas no início da manhã de cada dia de coleta. As avaliações consistiram no rendimento, teor e caracterização da composição química do óleo essencial. O

rendimento do óleo foi determinado em função da massa fresca total das folhas e estimado o rendimento por hectare (kg ha^{-1}), levando-se em consideração uma população de 12500 plantas por hectare ($0,8 \times 1,0 \text{ m}$). O teor do óleo essencial foi determinado a partir da relação entre massa do óleo e massa fresca de folhas (Eq. 1), expresso em porcentagem.

$$T(\%) = [\text{Massa do óleo (g)} / \text{Massa fresca de folhas (g)}] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

No entanto, pela presença de pouco material vegetal para extração do óleo essencial durante o cultivo de inverno, houve necessidade de juntar todos os blocos com o mesmo tratamento para obter material representativo para extração. Desta forma, os resultados de rendimento e teor desta estação foram apenas apresentados em gráficos, sem análise estatística.

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial foi determinada através de análise cromatográfica. O óleo essencial extraído foi acondicionado em frascos escuros e mantidos em freezer, para posterior envio ao Laboratório de Extrativos Vegetais, pertencente à Universidade Federal de Santa Maria, onde se procederam as análises cromatográficas.

A análise por GC-MS TIC foi realizada usando cromatógrafo a gás Agilent 6890 acoplado com um detector seletivo de massa Agilent 5973, sob as seguintes condições: coluna HP5-MS (5% - fenil – 95% - metylsiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm); EIMS: 70 Ev. Condições de funcionamento: divisão de fluxo 1:100; programa de temperatura, 40-260 °C; 40 °C durante 4 min; rampa, 4 °C/min; gás carregador He; 1 ml/min de fluxo; temperatura do injetor e detector, 220 °C; temperatura interface de 250 °C.

Os constituintes dos óleos foram identificados com base no índice de retenção (IR) e dos modelos de fragmentação de espectro de massas, em comparação com os dados da literatura (NIST, 2018). A concentração dos constituintes foi calculada usando a área total dos seus picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtido

por análise utilizando cromatografia de gás, com detector de ionização de chama (DIC), sendo o resultado expresso em porcentagem.

Para o teor e rendimento do óleo essencial, os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, realizou-se análise de regressão para o fator disponibilidade hídrica e comparação de médias para o fator sazonalidade, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Genes (Cruz, 2013). Os componentes químicos identificados no óleo essencial foram apenas caracterizados, sendo as porcentagens apresentadas em Tabela e análises complementares de *Heatmap* e de componentes principais (*Score plot* e *loading plot*) foram realizadas pelo software MetaboAnalyst 4.0.

5.5 RESULTADOS

Os resultados da análise de variância demonstraram que as variáveis teor e rendimento de óleo essencial apresentaram interação significativa entre os fatores disponibilidade hídrica x sazonalidade, pelo teste F ($p < 0,05$). O teor, rendimento e composição química do óleo essencial das plantas de *Aloysia triphylla* apresentaram variações em função das diferentes disponibilidades hídrica e da sazonalidade. Para a variável teor de óleo essencial observou-se que o inverno apresentou redução do teor em função do aumento da disponibilidade hídrica, atingindo 0,99%, 0,75% e 0,65% nas condições de 25%, 50% e 75% da capacidade de campo, respectivamente (Figura 1). Para a estação de verão, houve resposta quadrática, sendo que a disponibilidade hídrica de 25% e 100% da capacidade de campo apresentaram os maiores teores de óleo (0,60% e 0,65%, respectivamente). Para as demais estações (outono e primavera), nenhuma equação de regressão foi significativa ($p > 0,05$), demonstrando que a disponibilidade hídrica não afetou o teor de óleo essencial das plantas.

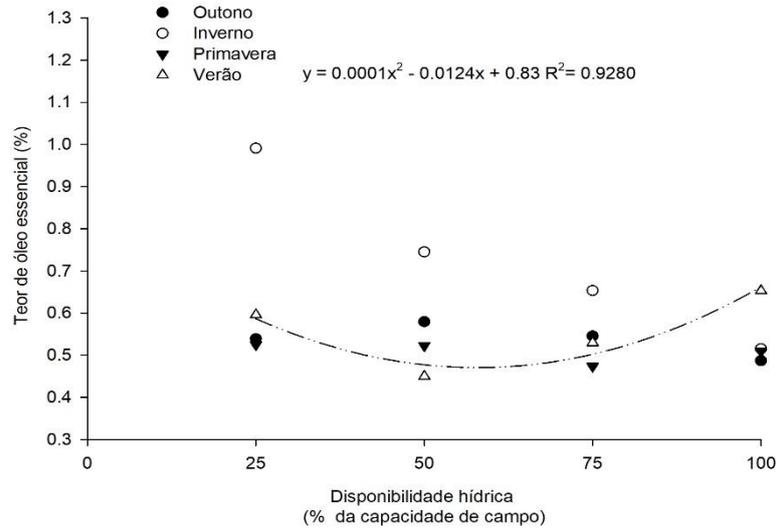


FIGURA 1. Teor de óleo essencial (%) de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes condições de disponibilidade hídrica e sazonalidade.

Para o rendimento de óleo essencial observou-se que para todas as estações, conforme equações de regressão, houve resposta linear crescente em função do aumento da disponibilidade hídrica, com superioridade na primavera, seguida pela estação do verão (Figura 2). Para primavera e verão, os maiores rendimentos de óleo essencial foram encontrados com 100% da capacidade de campo (4,93 e 3,70 kg ha⁻¹, respectivamente). Para o outono os rendimentos foram bem inferiores atingindo a maior média com 100% da capacidade de campo (1,90 kg ha⁻¹).

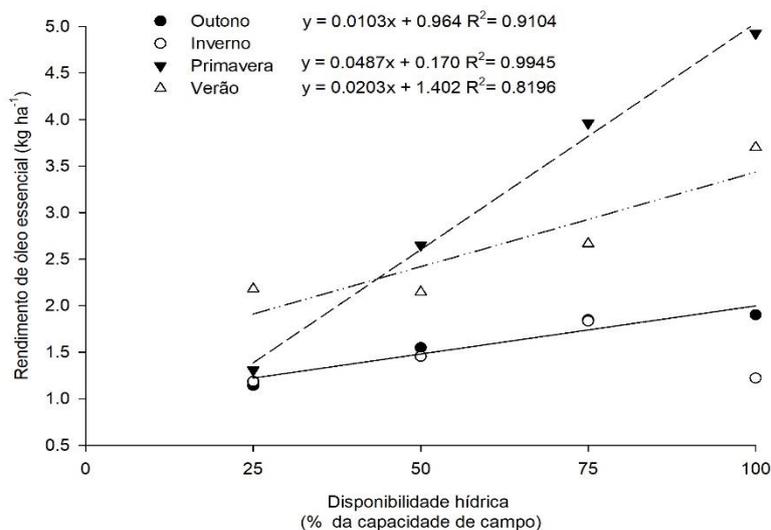


FIGURA 2. Rendimento de óleo essencial (kg ha⁻¹) de *Aloysia triphylla* submetidas a diferentes condições de disponibilidade hídrica e sazonalidade.

Para a caracterização química do óleo essencial, observou-se que houve grande variação dos componentes em função das diferentes disponibilidades hídrica durante o cultivo no inverno, primavera e verão. Os componentes caracterizados foram 6-metil-5-hepten-2-ona, β -pineno, Limoneno, *Z*-ocimeno; Linalool; *cis*-*p*-Mentha-2,8-dien-1-ol; *E*-Pinocarveol; 2-pineno-4-ol; *Z*-sabinol; 2-pineno-10-ol; Ciclohexano; Dihydrocarveol; *E*-Carveol; Carveol; α -terpineol; *Z*-geraniol; β -citronellol; *Z*-carveol; β -citral; Carvone; *E*-geraniol; α -citral; Acetato de geraniol; Acetato de nerol; β -bourbonene; α -cedreneo; β -cariofileno; β -cubebeno; α -cariofileno; Aromadendreno; α -curcumeno; Valencene; α -farnesene; α -longipinene; α -zingiberene; γ -cadineno; δ -cadineno; β -cadineno; Nerolidol; Espatuleno; Óxido de cariofileno; α -santalol; δ -cadinol; α -cadinol e Cedr-8-en-13-ol (Tabela 1).

Os resultados apresentaram que no inverno foi possível caracterizar menor quantidade de componentes no óleo essencial, quando comparado com a primavera e verão. O verão foi a estação que mais apresentou componentes no óleo, porém, para todas as estações houve modificações nas concentrações em função da disponibilidade hídrica. Os componentes com maiores concentrações identificados foram o α -citral e β -citral em todas as estações, limoneno para as estações de primavera e verão e óxido de cariofileno no verão. No inverno houve maior concentração de α -citral e β -citral, na condição de 25% da capacidade de campo (47,96% e 33,73%, respectivamente). No entanto, para a mesma condição houve aumento na concentração de limoneno (7,86%), sendo que com o aumento da disponibilidade hídrica teve-se redução na concentração desse constituinte (Tabela 1).

TABELA 1. Porcentagem dos componentes químicos do óleo essencial de *Aloysia triphylla* submetidos a diferentes disponibilidades hídricas durante as estações de inverno, primavera e verão.

Componente	Inverno				Primavera				Verão				*IK	
	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	IK _{Calc}	IK _{Tab}
6-metil-5-hepten-2-ona	-	0,32	-	0,65	0,67	1,62	2,14	2,11	-	0,15	0,19	0,18	984	984
β-pineno	-	-	-	-	-	0,17	0,26	-	-	-	0,11	-	988	988
Limoneno	7,86	3,28	2,82	2,22	18,75	16,32	15,08	15,94	1,73	11,39	13,94	11,47	1027	1027
Z-ocimeno	-	0,27	-	-	1,13	1,54	1,44	0,78	-	0,18	0,28	0,18	1046	1045
Linalool	-	0,39	-	0,20	0,12	0,26	0,52	0,34	0,15	0,20	0,28	0,27	1098	1098
cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,24	0,09	-	1120	1122
E-pinocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	0,47	0,55	0,41	1135	1135
2-pineno-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,34	0,45	0,40	1147	1145
Z-sabinol	-	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1161	1170
2-pineno-10-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,09	-	1160	1152
Ciclohexano	-	-	1,41	0,61	0,21	0,54	0,85	0,43	0,10	0,32	0,55	0,55	1179	1171
Dihydrocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,30	0,43	-	1192	1192
E-carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	0,24	0,20	0,11	1197	1196
Carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	0,49	0,36	0,43	1217	1225
α-terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	0,61	0,11	0,13	1223	1223
Z-geraniol	-	0,78	-	0,32	0,52	2,09	1,04	0,69	-	-	0,08	0,39	1222	1225
β-citronellol	-	-	-	-	-	1,11	-	-	-	-	-	-	1225	1226
Z-carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55	0,07	-	0,06	1230	1230
β-citral	33,73	30,41	31,74	30,21	24,19	18,29	19,89	24,06	10,41	17,90	20,76	23,69	1238	1238
Carvone	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,95	0,68	0,54	1242	1242
E-geraniol	-	1,22	-	0,81	2,39	3,33	1,52	1,51	6,15	0,77	0,46	0,48	1249	1254
α-citral	47,96	38,80	41,01	40,42	31,20	23,12	24,85	32,64	15,17	24,12	26,74	30,94	1268	1270
Acetato de geraniol	-	0,31	0,22	3,39	2,24	3,04	3,22	2,07	-	-	-	-	1357	1357
Acetato de nerol	2,78	5,09	4,86	1,32	-	0,08	0,10	0,06	1,72	1,91	2,19	2,28	1376	1375
β-bourbonene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,12	0,12	-	1382	1382
α-cedreneo	-	0,16	-	-	-	-	-	-	0,44	0,33	0,35	0,19	1418	1418
β-cariofileno	0,20	3,29	3,05	2,66	6,34	8,73	8,73	7,24	2,63	3,14	3,80	3,37	1418	1418
β-cubebeno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	-	-	-	1423	1426
α-cariofileno	-	-	-	-	-	0,19	0,08	-	0,05	-	-	0,05	1454	1454
Aromadendreno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	1458	1460
α-curcumeno	1,46	3,63	3,54	4,38	3,53	5,08	5,24	3,22	4,61	3,43	3,79	3,36	1480	1480
Valencene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	0,52	0,78	0,52	1494	1494
α-farnesene	-	-	-	-	1,78	3,04	3,31	1,37	-	-	-	-	1494	1496
α-longipinene	-	-	-	-	-	-	-	0,47	-	-	-	-	1508	1505
α-zingiberene	-	0,38	-	-	0,58	1,05	1,25	-	0,20	0,30	0,49	0,38	1508	1508
γ-cadineno	-	-	-	-	-	0,11	-	-	0,49	0,34	0,36	0,29	1512	1511
δ-cadineno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,05	-	-	1516	1516
β-cadineno	-	-	-	-	-	0,07	-	-	0,07	-	-	-	1516	1518
Nerolidol	-	0,38	-	0,40	-	-	0,08	0,09	0,27	0,11	-	-	1559	1558
Espatulenol	1,35	3,19	2,83	3,90	1,92	2,48	2,36	1,31	9,90	4,99	3,43	2,90	1575	1575
Óxido de cariofileno	3,42	3,54	3,38	5,76	4,03	5,36	4,79	3,56	30,99	17,57	11,28	10,35	1580	1580
α-santalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	1636	1643
δ-cadinol	0,21	0,77	0,62	0,99	0,59	1,80	1,88	1,04	4,66	2,67	2,17	1,96	1640	1640
α-cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	3,33	1,46	0,92	0,73	1654	1654
Cedr-8-en-13-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	2,27	0,94	0,27	-	1668	1668
Total médio das amostras identificadas (%)	98,97	97,10	97,19	98,22	98,84	99,59	98,81	98,92	95,70	97,03	96,30	96,76		
Porcentagem de Monoterpenos (%)	92,32	81,75	83,77	80,13	80,22	71,68	71,08	80,62	34,51	61,00	68,53	72,56		
Porcentagem de Sesquiterpenos (%)	6,65	15,35	13,42	18,09	18,62	27,91	27,72	13,30	61,19	36,03	27,77	24,20		

*IK: Índice de Kovats; IK_{Calc}: Índice de Kovats calculado; IK_{Tab}: Índice de Kovats tabelado; - : Componente não detectado.

Para a primavera, as maiores concentrações dos componentes foram encontradas com α -citral em 100% da capacidade de campo (32,64%) e β -citral com 25% da capacidade de campo (24,19%). Além disso, a estação promoveu as maiores concentrações de limoneno em 25% da capacidade campo (18,75%) e β -cariofileno em condições hídricas de 50% e 75% da capacidade de campo (8,73%), quando comparado com as outras estações. No verão, observou-se elevada concentração de óxido de cariofileno em 25% de disponibilidade hídrica (30,99%), sendo que para α -citral e β -citral houve incremento da concentração em disponibilidade hídrica de 100% da capacidade de campo (30,94% e 23,69%, respectivamente). Além do mais, outro componente que se pode destacar para essa estação é o limoneno, que apresentou maior concentração em 75% da capacidade de campo (13,94%), porém, apenas 1,73% em disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de campo (Tabela 1).

A visualização intuitiva da concentração de cada componente é fornecida pelo *Heatmap*, sendo esta ferramenta bastante útil para identificar as condições em que os componentes químicos do óleo essencial são altos ou baixos. Com isso, o *Heatmap* gera uma escala que permite identificar a disponibilidade hídrica e a estação do ano que favorece o aumento de determinado componente químico do óleo essencial, sendo que quanto mais escuro maior é a concentração do componente (Figura 3). Por exemplo, observou-se que o verão com 25% da disponibilidade hídrica possibilitou maior concentração de *Z*-carveol, *E*-geraniol, β -bourbonene, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, δ -cadinol e Cedr-8-en-13-ol. No entanto, para essa condição se observa que o α -citral e β -citral não possuem concentração muito elevada, em função da célula apresentar coloração clara. Para α -cariofileno e *Z*-geraniol, observou-se que a primavera com 50% da capacidade de campo representou maior coloração. Para α -citral e β -citral, que são componentes majoritários da *Aloysia triphylla* e identificados em todas as amostras, observou-se que a escala de cinza permitiu menor distinção de contraste, porém, com coloração mais escura no inverno com

25% da capacidade de campo. Além disso, para o limoneno observou-se que a primavera apresentou maior coloração escura às demais, com destaque para a disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de campo, facilitando a visualização da concentração de cada componente em relação a cada tratamento (Figura 3).

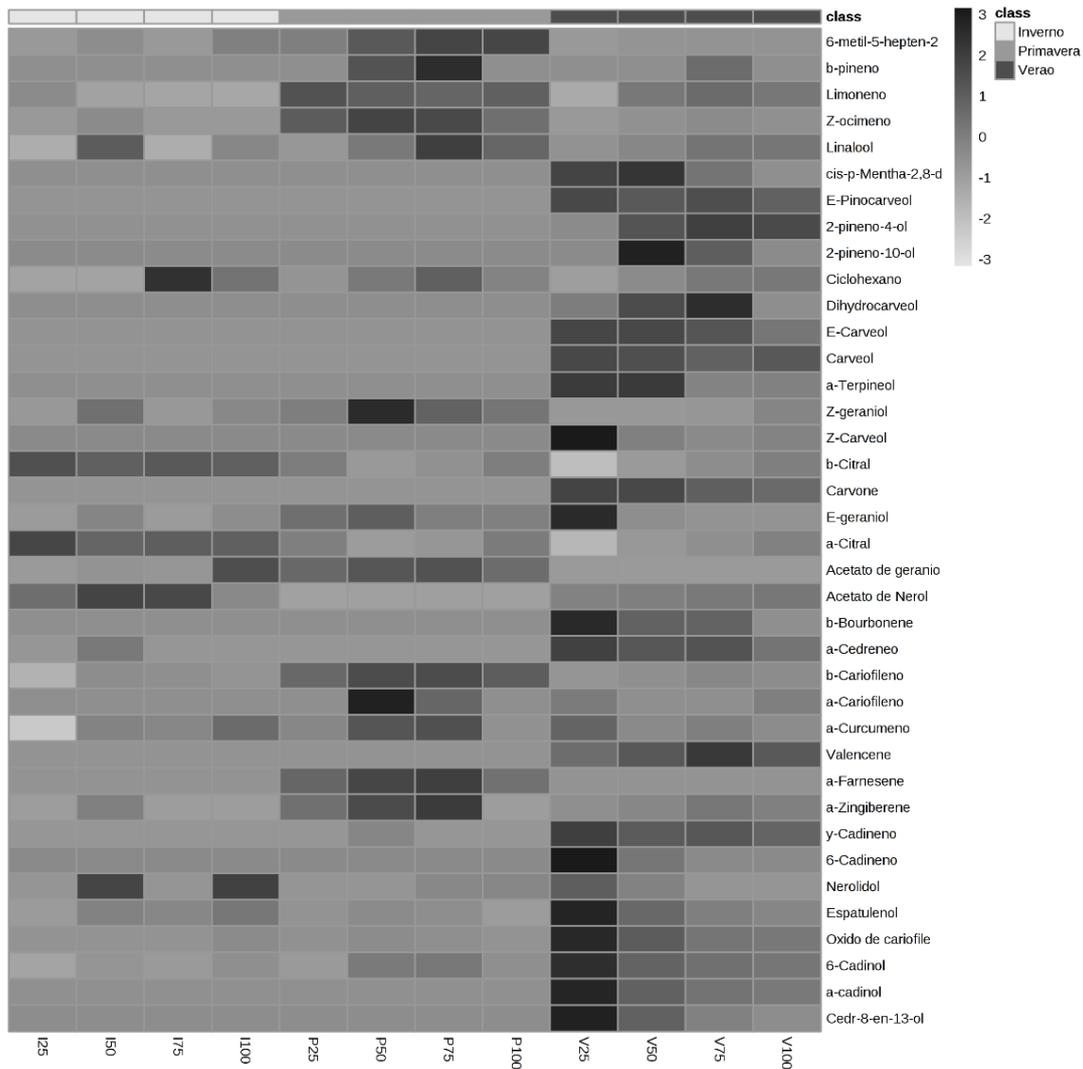


FIGURA 3. Heatmap dos componentes químicos do óleo essencial de *Aloysia triphylla* submetidos a diferentes disponibilidades hídricas durante as estações de inverno, primavera e verão.

A análise de componentes principais demonstraram a formação de três grupos, correspondentes a cada estação, sendo que o maior grupo foi de verão (Figura 4A). Os pontos com disponibilidade hídrica de 25% da capacidade de campo no verão, 50% na

primavera e 25% no inverno foram os que mais se distanciaram dos demais. Os componentes principais explicaram 94,6% do total de variação, indicando que os componentes do óleo essencial nas diferentes estações e disponibilidades hídricas são diferentes quimicamente, assim como observado na Tabela 1.

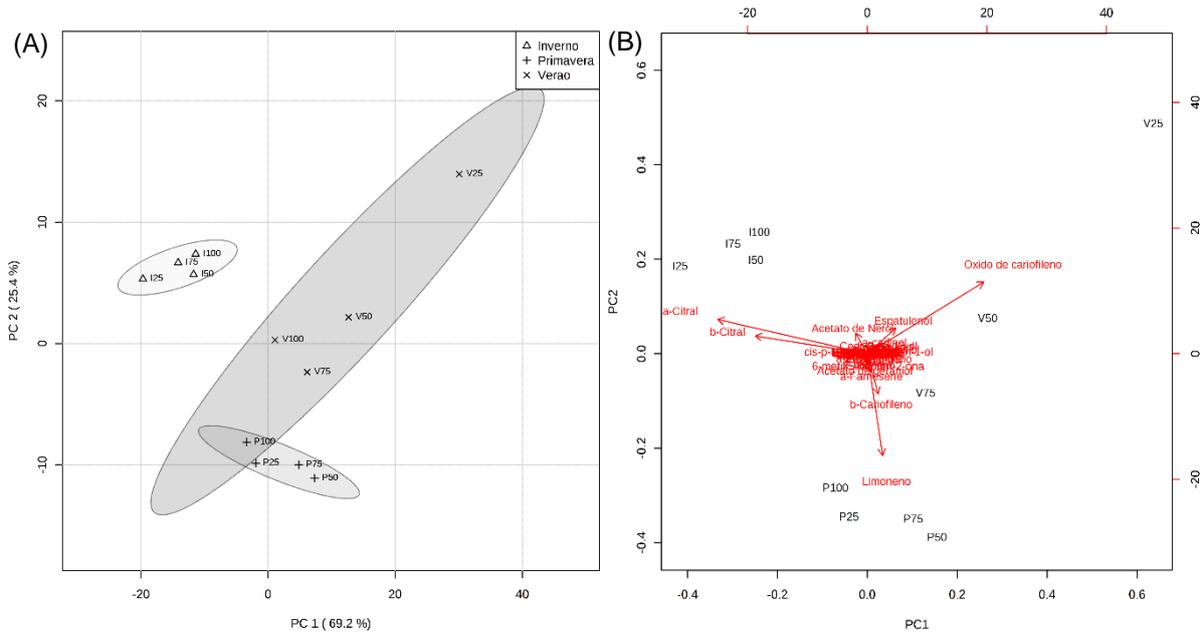


FIGURA 4. Score plot (A) e *loading* plot (B) da análise de componentes principais derivados da análise metabolômica não direcionada dos componentes de óleo essencial obtidos em diferentes disponibilidades hídricas durante o inverno, primavera e verão.

Para a análise metabolômica não-direcionada realizada com a finalidade de verificar a associação dos componentes com a disponibilidade hídrica, observou-se que alguns componentes se direcionaram para cada grupo das estações e disponibilidades hídricas (Figura 4B). Os componentes majoritários α -citral e β -citral apresentaram maior localização em direção ao inverno com baixas disponibilidades hídricas. Da mesma forma, no verão o espatulenol e óxido de cariofileno também se direcionaram para as condições de baixas disponibilidades hídricas. Para o grupo da primavera, observou-se maior direcionamento dos componentes limoneno e β -cariofileno, concordando com as percentagens dos

componentes encontrados em cada estação e disponibilidade hídrica. Os demais componentes encontrados, ficaram localizados no centro do *loading* plot (Figura 4B).

5.6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a disponibilidade hídrica e a sazonalidade afetam diretamente o rendimento, teor e também modificam a composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla*. Observou-se que a estação que promove maior rendimento, não é a mesma que apresenta maior teor de óleo. Além disso, para cada condição em que as plantas estavam expostas, a concentração e os componentes caracterizados no óleo essencial foram modificadas.

O teor de óleo essencial é uma das principais variáveis a ser avaliada quando se trabalha com espécies aromáticas (Schwerz et al., 2015), pois representa porcentagem de óleo essencial presente em determinada quantidade de folhas. A baixa disponibilidade hídrica durante o cultivo no inverno apresentou maior teor de óleo essencial, enquanto que o rendimento foi maior durante a primavera com disponibilidade hídrica próxima da capacidade de campo, justificado em função da estação proporcionar maior produção de fitomassa.

As diferenças no teor de óleo essencial durante o ano ocorrem em função dos elementos meteorológicos, principalmente temperatura e radiação (Paulus et al., 2013). Com isso, os maiores teores de óleo essencial obtidos no inverno, são provenientes de estresse gerados pelas baixas temperaturas e intensidade luminosa. Além disso, em diversos casos, o estresse hídrico proporciona resposta positiva para acumular metabólitos secundários em plantas medicinais e aromáticas, além de alterar a composição química do óleo essencial conforme também constatado por Khorasaninejad et al. (2011); Nowak et al. (2012) e Pravuchi et al. (2010). Essas afirmações confirmam os resultados obtidos, pois no inverno conforme foi reduzindo a disponibilidade hídrica ocorreu aumento no teor do óleo

essencial e as variações meteorológicas afetaram tanto o teor como a composição química do óleo essencial. O aumento do teor de óleo essencial sob baixa disponibilidade hídrica, pode ser justificado pela redução de absorção de CO₂ em função do fechamento estomático, reduzindo sua fixação e gerando excedente de NADPH que acabam produzindo compostos reduzidos (Selmar & Kleinwachter, 2013). Da mesma forma, o fechamento estomático e a baixa fixação de carbono podem justificar, o maior teor de óleo essencial encontrado no inverno.

O estresse térmico por baixas temperatura normalmente é mais estressante que por calor, pois reduz a velocidade das reações químicas, reduzindo a energia metabólica disponível, além de restringir a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, interromper o crescimento. A baixa temperatura promove parada da corrente citoplasmática, seguida pelo impedimento do processo fotossintético e destruição das clorofilas por fotooxidação (Larcher, 2000). Diante disso, com baixas temperaturas, associado ao estresse hídrico, as plantas tendem a produzir outros compostos a partir do metabolismo secundário, gerando maior produção de óleo essencial. Quanto menor for a temperatura e maior a duração do estresse, maior será a injúria.

Os fatores ambientais atuam diretamente sobre a fotossíntese e respiração, influenciando indiretamente na produção de metabólitos secundários (Lima et al., 2016). A intensidade luminosa, por exemplo, pode alterar a produção de óleo essencial em função da ativação de enzimas fotossensíveis envolvidas na rota do ácido mevalônico, precursor dos terpenos que são constituintes químicos dos óleos essenciais (Souza et al., 2011). Alguns trabalhos demonstram que existe uma tendência de ocorrer redução no teor de óleo essencial em relação ao longo do dia, ou seja, conforme aumenta a intensidade luminosa ocorre redução do teor de óleo (Santos et al., 2009). A menor intensidade luminosa característica da estação do inverno também pode justificar o maior teor de óleo essencial

encontrado nesta estação, em função da baixa intensidade luminosa não afetar as enzimas e, conseqüentemente influenciar sobre os componentes químicos do óleo essencial.

Em estudo com *Aloysia triphylla*, Schwerz et al (2015) observaram maior teor de óleo essencial no cultivo de inverno e verão com maiores disponibilidades hídricas, com valores médios de 0,56% e 0,53%, respectivamente. Botrel et al. (2010) em estudo com *Hyptis marrubioibes*, observaram maior teor de óleo essencial durante cultivo no verão. De maneira parcialmente semelhante, no presente estudo foram obtidos maiores teores de óleo essencial no inverno, porém, com menores disponibilidades hídricas (0,99% em 25% da capacidade de campo). No verão, o teor foi superior as demais estações somente na disponibilidade hídrica de 100% da capacidade de campo, com teor aproximadamente de 0,65%, corroborando com os resultados encontrados pelos autores citados acima.

O rendimento de óleo essencial aumentou em função da maior disponibilidade hídrica, com destaque para o cultivo nas estações de primavera e verão. Possivelmente, o maior rendimento de óleo essencial nestas estações estão relacionados com a fitomassa produzida nesses períodos, pois a *Aloysia triphylla* é uma planta de clima tropical e subtropical e tende a perder suas folhas nos meses mais frios do ano (final de outono), podendo perder todas as folhas em caso de ocorrência de geadas (Paulus et al., 2013). De maneira semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, Prochnow et al. (2017), encontraram maior rendimento de óleo essencial no verão em todos os períodos de déficit hídrico, com média de 27,54 kg ha⁻¹ para essa estação. No entanto, no presente estudo o maior rendimento foi de apenas 4,93 kg ha⁻¹ para a estação de primavera com disponibilidade hídrica de 100% da capacidade de campo.

A estação de verão possibilitou caracterizar maior quantidade de componentes químicos, enquanto que menores foram encontrados no inverno. O citral é o componente majoritário do óleo essencial de *Aloysia triphylla* e que apresenta maior interesse pela indústria sendo constituído basicamente pela mistura dos isômeros α -citral e β -citral (Rojas

et al., 2012). O inverno e a primavera foram as estações que apresentaram condições para acumular maiores concentrações desse componente. Esses resultados não estão de acordo com Prochnow et al. (2017) que encontraram maiores concentrações de citral no óleo essencial de *Aloysia triphylla* nas estações de outono e verão, atingindo valores totais de 56% do componente. Da mesma forma, Paulus et al. (2013) avaliando a composição do óleo essencial da mesma espécie durante todos os meses do ano, encontraram maiores concentrações de α -citral e β -citral nos meses de janeiro e março (verão), com concentração total em torno de 66% de citral. No entanto, as concentrações encontradas no presente estudo ficaram próximas dos autores citados acima, sendo de 73,57%; 49,56% e 42,43% para inverno, primavera e verão, respectivamente.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários que conferem odor característico para cada espécie, sendo que os componentes químicos são derivados de compostos terpênicos, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenipropanóides (Miranda et al., 2016). Os monoterpenos são caracterizados por moléculas menores e de baixa densidade, facilitando a volatilização, podendo atuar como atrativo para polinizadores (Amaral et., 2015). Como observado nos resultados, a porcentagem de monoterpenos foi superior em todas as estações e disponibilidades hídricas, exceto, para 25% da capacidade de campo no verão, onde houve maior proporção de sesquiterpenos. No entanto, a maior porcentagem de monoterpenos foram encontrados no inverno, possivelmente em função das maiores concentrações de α -citral e β -citral obtidas nessa estação. Esses dois componentes são determinantes da qualidade do óleo essencial para comercialização, enquanto que também é necessário baixa porcentagem de *Z*-geraniol e *E*-geraniol (Tabatabaie e Nazari, 2007). No presente estudo, foram encontrados valores entre 0,08-2,087% de *Z*-geraniol e 0,458-6,148% *E*-geraniol, sendo que em algumas condições não foi identificado esses componentes, como no inverno com 25 e 75% da capacidade de campo.

O limoneno foi outro monoterpeneo de grande importância encontrados em maiores concentrações no cultivo da primavera e verão, e reduzindo no inverno. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Prochnow et al. (2017), em que a concentração foi superior para verão, primavera, outono e inverno, respectivamente. Da mesma forma, Paulus et al. (2013) encontraram maiores concentrações de limoneno de setembro a abril, reduzindo nos meses de maio a agosto. Além disso, no verão a menor disponibilidade hídrica afetou a concentração de limoneno, que foi compensado pela maior concentração dos sesquiterpenos óxido de cariofileno e espatulenol. A baixa taxa de assimilação de CO₂ pode reduzir a fotossíntese e, conseqüentemente a produção de monoterpeneos (Delfine et al., 2005). Portanto, a baixa disponibilidade hídrica no verão reduziu a fotossíntese e também a produção de monoterpeneos, visto que esse grupo é dependente de CO₂ para sua formação.

Os monoterpeneos são os principais componentes encontrados em óleos voláteis, sendo que estes apresentam 10 átomos de carbono, enquanto os sesquiterpenos contêm 15 átomos (Khayyat & Roselin, 2018). Os sesquiterpenos, ao contrário dos monoterpeneos, são maiores, mais densos e menos voláteis, geralmente desempenhando a função de proteção na planta (Amaral et al., 2015). Os principais componentes identificados desse grupo foram óxido de cariofileno e espatulenol no verão com 25% da capacidade de campo e β-cariofileno na primavera com 50% e 75% da capacidade de campo. Castelo et al. (2012), encontraram maiores percentuais de sesquiterpenos (óxido de cariofileno, β-cariofileno, β-guaiano, α-humuleno e viridiflorol) no óleo essencial de folhas de *Psidium myrsinites* com maiores percentuais dos componentes nos meses mais secos. Esses resultados corroboram com os encontrados com *Aloysia triphylla*, em que a deficiência hídrica no verão promoveu maior produção de sesquiterpenos quando comparados com os monoterpeneos, possivelmente em função do aumento da concentração de óxido de cariofileno e redução de citral.

A análise metabolômica fornecida pelo *Heatmap*, *score plot* e *loading plot*, apresentaram relação direta em relação a concentração de cada componente identificado nas amostras, facilitando a interpretação e análise dos dados. A análise metabolômica é uma ferramenta analítica que possibilita a identificação de mudanças com base no perfil químico, assim como a criação de perfis químicos baseados na concentração dos metabólitos produzidos pelas plantas (Ibáñez et al., 2013). Ou seja, foi possível identificar a disponibilidade hídrica e estação do ano que favoreceram o acúmulo e a concentração dos principais componentes presentes no óleo essencial.

De maneira geral, a composição química foi influenciada pela disponibilidade hídrica e sazonalidade, assim como o rendimento e o teor de óleo essencial. Assim sendo, a condição hídrica e a estação do ano para o cultivo de *Aloysia triphylla* torna-se dependente do intuito da produção, ou seja, quantidade ou qualidade do óleo essencial. Isso é dependente, pelo fato da estação e da disponibilidade hídrica que promovem maior rendimento de óleo essencial, não coincidir com a mesma estação que possui maior teor e/ou concentração de citral, que é o componente de maior interesse da espécie.

Por fim, conclui-se que o teor de óleo essencial é elevado no inverno sob baixa disponibilidade hídrica. No entanto, o rendimento de óleo por unidade de área é superior quando cultivado na primavera com disponibilidade hídrica próxima da capacidade de campo. O verão se caracterizou por apresentar maior quantidade de componentes do óleo. O inverno apresenta menos componentes, contudo, a baixa disponibilidade hídrica favorece o aumento da concentração de citral. A primavera em todas as disponibilidades hídricas e no verão com 50%, 75% e 100% da capacidade de campo aumentam a concentração de limoneno. O verão com 25% da capacidade de campo afeta negativamente a concentração de citral, porém, favorece a concentração de óxido de cariofileno e espatulenol.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

5.7 REFERÊNCIAS

ALVARES, C.A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. Doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507

AMARAL, L.P. et al. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 12-21, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201502462>

ASBAHANI, A.E. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069

BEZERRA, A.M.E. et al. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 26-29, 2008.

BOTREL, P.P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* EpL. Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010. Doi: 10.4025/actasciagron.v32i3.3415

BRANT, R.S. et al. Teores do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton (Verbenaceae)] em diferentes horários de colheita e processamentos pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 2065-2068, 2009. Doi: 10.1590/S1413-70542009000700061

CASTELO, A.V.M. et al. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 8, p. 753-760, 2012. Doi: 10.3923/jas.2012.753.760

CRUZ, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. Doi: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

DELFINE, S. et al. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 106, n. 2-3, p. 243-252, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.012>

FREIRE, C.M.M. et al. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 161-166, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.013>

FURLANI, P.R. **Cultivo de frutas e hortaliças em ambiente protegido**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2009. 37p.

GHASSEMI-GOLEZANI, K. et al. Changes in essential oil-content and composition of ajowan (*Carum copticum* L.) seeds in response to growth regulators under water stress. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p. 219-226, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.011>

GRESSLER, L.T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 6, p. 1061-1072, 2014. Doi: 10.1111/are.12043

IBÁÑEZ, C. et al. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 100-111, 2013. Doi: 10.1016/j.trac.2013.06.015

KHAYYAT, S.A.; ROSELIN, L.S. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 855-875, 2018. Doi: 10.1016/j.jscs.2018.01.008

KHORASANINEJAD, S. et al. The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 22, p. 5360-5365, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531p.

LIMA, A.E.F. et al. Rendimento, caracterização química e antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. **Magistra**, v. 28, n. 3/4, p. 369-378, 2016.

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

MEIRA, M.R. et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 779-785, 2013.

MIRANDA, C.A.S.F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento de espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016. Doi: 10.5935/1806-6690.20160025

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.

MORAIS, S.R. de et al. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, 2012. Doi: 10.1155/2012/363919

NIST. National Institute of Standards and technology. NIST, Livro de Química da Web, SRD 69. Doi: <https://doi.org/10.18434/T4D303>. Acesso em: outubro de 2017.

NOWAK, M. et al. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. **Journal of applied botany and food quality**, v. 83, n. 2, p. 133-136, 2010.

PARODI, T.V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013. Doi: 10.1590/S1516-89132013000200014

PARODI, T.V. et al. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 323-334, 2014. Doi: 10.1007/s10695-013-9845-z

PAULUS D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.

PETROPOULOS, S.A. et al. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 4, p. 393-397, 2008. Doi: 10.1016/j.scienta.2007.10.008

PINHEIRO, C.G. et al. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 176-184, 2016. Doi: 10.1590/1519-6984.16314

- PRAVUSCHI, P.R. et al. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na produção de óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 684-693, 2010. Doi: 10.4025/actasciagron.v32i4.316
- PROCHNOW, D. et al. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.
- ROJAS, J. et al. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 29, n. 1, p. 61-68, 2012.
- SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.
- SCHWERZ, L. et al. Biomassa e teor de óleo essencial em *Aloysia triphylla* (l'hérit) Britton submetida a diferentes níveis de reposição hídrica e à variação sazonal das condições ambientais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 631-641, 2015. Doi: 10.1590/1983-084X/13_008
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 558-566, 2013. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.020
- SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.
- SILVA, R. **Crescimento e teor de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton (Verbenaceae), em função da adubação orgânica, sazonalidade, horário de colheita e processamento pós-colheita.** 2005. 66p. Dissertação (Mestrado-Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SOUZA, M.F. et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011. Doi: 10.5007/2175-7925.2011v24n1p9
- TABATABAIE, S.J.; NAZARI, J. Influence of nutrient concentrations and NaCl salinity on the growth, photosynthesis and essential oil content of peppermint and lemon verbena. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 31, n. 4, p. 245-253, 2007.

6 DISCUSSÃO GERAL

A *Aloysia triphylla* é uma planta que apresenta maior crescimento durante a estação da primavera atingindo máximo crescimento até metade do verão. No trabalho desenvolvido, pode-se considerar, de modo geral, que a produção de *Aloysia triphylla* é fortemente influenciada pela sazonalidade e disponibilidade hídrica. A maior produção de fitomassa nas estações de primavera e verão com maior disponibilidade hídrica são justificadas pelas condições meteorológicas dos períodos, que apresentam maior temperatura e radiação solar. De maneira geral, a primavera foi superior as demais, sendo que esses resultados estão diretamente interligados com os pigmentos fotossintéticos e densidade estomática, encontrados na estação. Os maiores conteúdos de pigmentos (clorofilas e carotenoides) indicam maior eficiência do processo fotossintético, promovendo maior absorção de radiação e conversão em fitomassa. Da mesma forma, a maior densidade estomática representa maior capacidade da planta em realizar trocas gasosas com a atmosfera, promovendo perda de água pela transpiração e absorção de CO₂ para o processo fotossintético. Esses processos são ainda mais favorecidos quando existe maior disponibilidade de água, como visto no trabalho.

O maior rendimento de óleo essencial na primavera com maior disponibilidade hídrica também se justifica em função da estação produzir maior quantidade de fitomassa onde se tem maior quantidade de material vegetal, e conseqüentemente maior rendimento por planta. No entanto, o teor de óleo essencial aumentou em condição de baixa disponibilidade hídrica no cultivo de inverno, assim como no verão com as disponibilidades hídricas de 25% e 100% da capacidade de campo. Esses resultados estão relacionados com a maior densidade de tricomas glandulares encontrados principalmente na porção abaxial, durante as estações de inverno e verão. Em *Aloysia triphylla*, o óleo essencial é armazenado basicamente em tricomas glandulares, sendo que quanto mais tricomas, maior tende a ser a produção de óleo essencial.

A caracterização química do óleo essencial foi alterada em função das diferentes disponibilidades hídricas nas estações de inverno, primavera e verão. O maior teor de óleo essencial no inverno é favorecido pelo aumento dos componentes majoritários (α -citral e β -citral). O componente óxido de cariofileno aumentou no verão com baixa disponibilidade hídrica, enquanto limoneno aumenta durante primavera. Portanto, a época e disponibilidade hídrica para o cultivo de *Aloysia triphylla* torna-se dependente do objetivo da produção, sendo que plantas em capacidade de campo durante o cultivo na primavera e verão aumentam o rendimento de óleo essencial, e em baixas disponibilidade hídrica no inverno aumenta o teor e a concentração de citral.

7 CONCLUSÃO GERAL

A sazonalidade e a disponibilidade hídrica afetam o crescimento vegetativo, pigmentos fotossintéticos, densidade de tricomas glandulares, assim como a produção e qualidade do óleo essencial de *Aloysia triphylla*.

Na primavera ocorre maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos e maior densidade estomática, indicando melhores respostas pelas plantas. Além disso, a estação da primavera, com maiores disponibilidades hídricas, é indicada para maior produção de fitomassa e rendimento do óleo essencial.

A densidade de tricomas glandulares aumentam nas estações de inverno e verão.

O inverno sob menores disponibilidades hídricas promove aumento no teor de óleo essencial e na concentração dos componentes majoritários α -citral e β -citral.

O verão apresenta maior quantidade de componentes químicos, sendo que a menor disponibilidade hídrica reduz a concentração dos componentes α -citral e β -citral, aumentando significativamente a concentração de óxido de cariofileno.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, I. C. A. et al. Fator de resposta do alecrim-pimenta a diferentes lâminas de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 462-468, 2012.
- BATISTA, L. A. et al. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 475-481, 2010.
- BECKER, A. G. et al. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? **Aquaculture**, v. 481, n. 1, p. 184-190, 2017.
- BIZZO, H. R. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. **A lavoura**, Rio de Janeiro, ano 116, n. 699, p. 48-53, 2013. Disponível em: <https://issuu.com/sociedadnacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_699>. Acesso em: 17 set. 2018.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BRANT, R. S. et al. Teor do óleo essencial de cidrão (*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton) em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.
- BRANT, R. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1401-1407, 2009.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.
- CALZADA-SÁNCHEZ, E. V. et al. Anatomía de hoja y tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México. **Botanical Sciences**, México, v. 92, n. 4, p. 469-480, 2014.
- FEITOSA, S. S. et al. Fisiologia do *Sesamum indicum* L. sob estresse hídrico e aplicação de ácido silicílico. **Irriga**, Botucatu, v. 21, n. 4, p. 711-723, 2016.
- FONSECA, J. M. et al. Potential implications of medicinal plant production in controlled environments: The case of feverfew (*Tanacetum parthenium*). **HortScience**, v. 41, n. 3, p. 531-535, 2006.
- GATTI, A. B. et al. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 74, n. 3, p. S64-S69, 2014.
- GATTUSO, S. et al. Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* palau) from Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 7, n. 4, p. 190-198, 2008.
- HABER, L. L.; CLEMENTE, F. M. V. T. **Plantas aromáticas e condimentares: uso aplicado na Horticultura**. Brasília: Embrapa, 2013. 152 p.

- HERBOTECHNIA. Cedron. Disponível em: <<http://www.herbotecnia.com.ar/aut-cedron.html>>. Acesso em: 18 set. 2018.
- LACERDA, C. F. et al. Análise de crescimento de milho e feijão sob diferentes condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 18-24, 2010.
- LOPES, N. F.; LIMA, M. G. S. **Fisiologia da produção**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. 492 p.
- MANUKYAN, A. Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. drought stress. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 119-125, 2011.
- MEIRA, M. R. et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 5, p. 779-785, 2013.
- MOORE, B. D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750, 2013.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.
- OLIVA, M. L. M. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 9, n. 1, p. 29-37, 2010.
- OZKAN, G.; BAYDAR, H.; ERBAS, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 205-209, 2010.
- PARODI, T. V. **Atividade antibacteriana e composição química dos extratos de *Aloysia triphylla* (L' Herit) Britton obtidos por fluido supercrítico (CO₂)**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- PARODI, T. V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 462-468, 2012.
- PARODI, T. V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013.
- PARODI, T. V. et al. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 323-334, 2014.
- PAROLIN, P. Submerged in darkness: adaptation to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. **Annals of Botany**, v. 103, n. 2, p. 359-376, 2009.

PAROLIN, P.; WITTMANN, F. Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. **AoB Plants**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

PAULUS, D. et al. Teor e Composição Química do Óleo essencial e Crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de Colheita. **Revista Ceres**, v. 60, n 3, p. 372-379, 2013.

PINTO, D. A. et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 54-61, 2014.

PROCHNOW, D. et al. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.

RAM, D.; RAM, M.; SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 7, p. 885-893, 2005.

RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influencia da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el trypanosoma cruzi en ratones. **Revista Peruana de Medicina Experimentale y Salud Publica**, v. 29, n. 1, p. 61-68, 2012.

SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S.; KUMAR, S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. S. et al. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 8-13, 2006.

SANTOS, V. M. C. S. et al. Seasonal variation of vegetative growth, essential oilyield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 790- 798, 2012.

SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Effect of seasonality on the essential oil yield of *Piper gaudichaudianum* kunth. **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 263-273, 2018.

SCHWERZ, L. et al. Biomassa e teor de óleo essencial em *Aloysia triphylla* (l'hérit) Britton submetida a diferentes níveis de reposição hídrica e à variação sazonal das condições ambientais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 631-641, 2015.

SCREMIN-DIAS, E.; LORENZ-LEMKE, A. P.; OLIVEIRA, A. K. M. The floristic heterogeneity of the Pantanal and the occurrence of species with different adaptive strategies to water stress. **Brazilian journal of biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 275-282, 2011.

SILVA, D. T. et al. Analysis of the seasonality effect on the essential oil yield of leaves of *Nectandra grandiflora* Nees. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 6, p. 1065-1072, 2015.

SILVA, E. B. P. et al. The seasonal variation of the chemical composition of essential oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (Annonaceae) and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13574-13587, 2013.

SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. Ed., Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2003.

VALENTAO, P. et al. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 10, p. 1324-1327, 2002.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418, p. 101-107, 2014.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 4, p. 933-940, 2016.

ZEPPENFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* - Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1362-1367, 2017.