

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

Guilherme Masarro Araujo

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOANATOMIA, FENOLOGIA E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL de *Aloysia
hatschbachii* (VERBENACEAE)**

Frederico Westphalen, RS
2020

Guilherme Masarro Araujo

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOANATOMIA, FENOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia hatschbachii* (VERBENACEAE)**

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

Orientador (a): Prof^{ta}. Dr^a. Denise Schmidt
Coorientador: Prof. Dr. Bráulio Otomar Caron

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Araujo, Guilherme Masarro
Caracterização da morfoanatomia, fenologia e composição química do óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* (Verbenaceae) / Guilherme Masarro Araujo.- 2020.
91 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, 2020

1. Cidró 2. Endêmica 3. Metabólitos secundários 4. Fenofases I. Schmidt, Denise II. Otomar Caron, Braulio III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

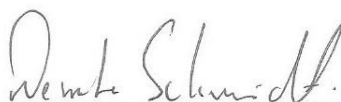
Declaro, GUILHERME MASARRO ARAUJO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Guilherme Masarro Araujo

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOANATOMIA, FENOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia hatschbachii* (VERBENACEAE)**

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

Aprovado em 18 de fevereiro de 2020:



Denise Schmidt, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Dr. (UFSC)



Felipe Schwerz, Dr. (UFLA)

DEDICATÓRIA

A Deus...
Meu avô Euclides Carvalho de Araujo (*In memoriam*)...
Meus pais, Rudimar Campos de Araujo e Luci Masarro Araujo...
e meus irmãos,
dedico-lhes este.

AGRADECIMENTOS

Estes sinceros agradecimentos vão à,

- à Deus, por me proporcionar a vida e por ser a base de tudo nesta, sendo também a resiliência que sempre necessitei.

- à minha família, especialmente meus pais Rudimar Campos de Araujo e Luci Masarro Araujo, que assim nos educaram e nos tornaram pessoas melhores e juntamente com meus irmãos Paulo, Pablo, Eduardo e Gabriel, que também me apoiaram e permitiram este momento. Agradeço a vocês, de coração, pela oportunidade de chegar a tal grau. E o Vô Euclides (*In memoriam*), pela preocupação de sempre, em saber como estavam as coisas do mestrado, que sempre perguntava quando eu iria para casa visitar todos.

- à minha orientadora e professora, Dr^a. Denise Schmidt, por confiar em minha pessoa tal responsabilidades. Pelos seus ensinamentos e conselhos, desde sala de aula, e também pelo seu reconhecimento com minha pessoa e que juntamente com o professor Dr. Bráulio, orientaram, aconselharam e permitiram um ambiente propício para a chegada deste dia.

- aos amigos, colegas e professor do “ex-bloco 8 2018”, Anderson, Evandro, Fábio, Leonardo e Marcos, pela amizade, confiança, risadas e ajuda. Leonardo e Marcos, que na questão da anatomia vegetal repassaram todo seu conhecimento e técnicas e assim, tornaram este trabalho o que ele é hoje. Ao Fábio, por indicar o PPGAA para inscrição. São amizades que levo para a vida.

- à Tagliane e Ricardo, “bloco 8 2019”, obrigado pelo carinho, amizade, companheirismo, risadas e principalmente a lealdade de vocês durante o ano de 2019. Sempre nos ajudando uns aos outros e isso nos tornou diferente. Vou sempre lembrar de vocês (lembrem-se da capacidade que vocês têm).

- à Felipe Dapper e Fagner Rontani, amigos e colegas, dividindo casa. Obrigado pelas conversas, mates, churrasco, ajudando sempre que necessário.

- aos integrantes do LABEVE, em especial à Nadia, Patrícia e a professora Dr^a. Berta pelas análises cromatográficas do óleo essencial.

- à Eder Eloy e todo seu grupo de pesquisa por ceder o espaço do laboratório de anatomia da madeira, onde boa parte do trabalho foi construído.

- à Heloise, engenheira agrônoma da Emater da cidade de Piên, que não mediu esforços em confirmar a localização da espécie, identificação e suporte para nos deslocarmos em busca da *Aloysia hatschbachii* em seu ambiente natural e endêmico no estado do Paraná.

- ao Daniel, motorista da UFSM-FW pela viagem até Piên-PR.

- aos colegas do LCTEA, Axel, Gabrieli, João, Jordana, Matheus, Marcos, Michele, Pedro e o técnico Davi pelos auxílios e ajudas em avaliações e principalmente pela descontração nas avaliações, o que as tornavam menos arduas.

- ao PPGAAA e a UFSM-FW pelo ensino público de qualidade e a capes pela concessão de bolsa.

- agradeço a todos que aqui não foram citados, mas que sabem que contribuíram para tal momento.

... à todos, meu muito obrigado!!!

“Seja como um pato, permaneça calmo na superfície e reme como um louco debaixo d'agua”

(Júnior Martins)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOANATOMIA, FENOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia hatschbachii* (VERBENACEAE)

AUTOR: Guilherme Masarro Araujo

ORIENTADORA: Denise Schmidt

O conhecimento sobre plantas, como é o caso de plantas aromáticas, apresenta grande valor devido a composição do óleo essencial, o qual pode conter substâncias de interesse, seja na agricultura, saúde pública/farmacologia, perfumaria, entre outras. Por este motivo, descrição detalhada da espécie e conhecimentos, otimiza atividades como manejo, metodologias de extração de óleo essencial, bem como órgão da planta e período adequado de coleta. Diante do exposto, a proposta do estudo foi descrever morfoanatomicamente as seções de folhas, flores, frutos, ramos e raízes, a fenologia (fenofases) e o rendimento e composição do óleo essencial da espécie nativa e endêmica do Brasil, *Aloysia hatschbachii* (Moldenke). A pesquisa foi desenvolvida na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen – RS, durante o período de 2018-2019. Para as descrições morfoanatômicas, foram realizadas em indivíduos adultos. Seções de folhas (maduras), flores, frutos, ramos e raízes foram submetidas a processo de desidratação e emblocados em historesina para cortes histológicos, posteriormente corados com azul de toluidina e fotomicrografados, sendo destacado as principais estruturas anatômicas, além do uso de microscopia eletrônica de varredura. Para a morfologia, fotos foram realizadas de exemplares à campo e em estruturas menores, como flores, com o auxílio de lupa. Para fenologia, foi avaliado uma população de cinco indivíduos, mensurando o percentual de intensidade e índice de atividade das fenofases de brotamento, folhas maduras, senescência foliar, queda foliar, floração e frutificação. As plantas foram propagadas pelo método de estaquia, para obtenção de material suficiente para extração do óleo essencial a partir do uso de clevenger modificado. Após três horas de fervura, o óleo essencial foi coletado e armazenado, para análise cromatográfica à gás e posterior identificação do componentes através do índice de retenção e concentração de cada componente utilizando a área total de seu pico, comparado com a área total de todos os picos. Como resultado, foi possível observa que as folhas são incompletas, simples e com disposição oposta cruzada e por vezes verticiladas, com consistência cartácea, margem serrada e nove pares de dente, com densa cobertura pilosa, apresentando tricomas glandulares e não-glandulares, com estômatos na face abaxial e do tipo anomocíticos. Os ramos com densa cobertura pilosa, com o súber apresentando descolamento, parênquima medular apresentando reservas de amido e feixes de fibras distribuídos ao entorno do ramo. Apresenta inflorescência racemosa, com pequenas brácteas acompanhando cada flor, a qual é de coloração branco-lilás, ovário supero e densamente coberta por pelos. Assim, a partir da morfologia e anatomia, foi possível identificar densa cobertura de pelos/tricomas, presente em órgão como folha, pecíolo da folha, ramos e flores. Fenologicamente, a espécie apresentou-se não decídua e com folhas maduras presente em todo o ciclo, sendo possível observar correlação com as variáveis meteorológicas avaliadas. O óleo essencial presente em tricomas glandulares, apresentou componentes com devido interesse para a área fármaco/saúde, com rendimento satisfatório de óleo essencial. O óleo essencial da *Aloysia hatschbachii* é majoritariamente composto por sesquiterpenos, tais como β -elemeno e germecrene B (22,6%), entre outros, além de apresentar monoterpenos e fenilpropanoides em concentrações

baixas. Pode se concluir que a espécie *Aloysia hatschbachii* apresenta características do gênero botânico *Aloysia*, como a presença de tricomas, com características de folhas não decídua e a fenologia influenciada pelas variáveis climática, e produção de óleo essencial com concentração elevada de sesquiterpenos (acima de 84%) e potencial ação antimicrobiana deste.

Palavras-chave: Cidró. Endêmica. Metabólitos secundários. Fenofases.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE MORPHOANATOMY, PHENOLOGY AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL FROM *Aloysia hatschbachii* (VERBENACEAE)

AUTHOR: Guilherme Masarro Araujo

ADVISOR: Denise Schmidt

Research efforts to determine essential oil contents in aromatic plants can be a valuable tool, since essential oils may contain substances of interest not only for agriculture but also for pharmacology, perfumery and the health sector alike. Therefore, investigating and giving a detailed description of a given species optimizes activities such as management and contributes information about plant structure, best time of harvest and best oil extraction method. The objective of this study is thus to describe the morphoanatomy of leaf, flower, fruit, stem and root structures, the phenology (phenophases) and also the essential oil composition and yield of Brazil's native endemic species *Aloysia hatschbachii* (Moldenke). The study was conducted in an experimental site of the Federal University of Santa Maria, Frederico Westphalen Campus, in Rio Grande do Sul state, over the period between 2018 and 2019. Adult plants were used for the morphological and anatomical descriptions. Portions of mature leaf, flower, fruit, stem and root tissues were subjected to a dehydration process, then embedded in HistoResin to obtain histological sections and later stained with toluidine blue and photomicrographed in the Laboratory of Wood Anatomy to identify the main anatomical structures, using a scanning electron microscope. For the morphological structures, pictures were taken from on-site sample specimens, depicting also small structures such as flowers with the help of a 4X magnifying lens. For the phenological description, five plant specimens were evaluated by measuring both the percent index of intensity and the index of activity of different phenophases, referred to as budding, mature leaves, leaf senescence, leaf fall, flowering and fruiting phases. The plant specimens were propagated vegetatively using plant cuttings in quantity sufficient to extract essential oil using a modified Clevenger apparatus. After three hours of boiling, the resulting essential oil was collected and sent to the Laboratory of Plant Extracts of the Federal University of Santa Maria to undergo gas chromatography analysis. The identification of components was based on both the retention index and concentration of each constituent, using the total area of its peak in comparison with the total area of all peaks. The analysis showed that leaves in this species are incomplete, simple and positioned predominantly in an opposite decussate arrangement but sometimes arranged in whorls, having a papery texture and serrated edge with nine pairs of teeth, being densely covered with hairs, and showing glandular and non-glandular trichomes, with anomocytic stomata on the abaxial surface. Stems are densely covered with hairs, have a peeling bark, with the pith parenchyma containing starch reserves and fiber bundles distributed around the stem. Inflorescences are racemose, with small bracts accompanying each purple-white flower, have superior ovary and are densely covered with hairs. These morphoanatomical characteristics show that plant organs such as leaf, leaf petiole, stem and flower structures are densely covered with trichomes. Phenologically, this species was found to be non-deciduous, holding mature leaves throughout the entire cycle, there also being correlations between phenophases and meteorological variables. The essential oil present in the trichome structures was found to have components of interest to the pharmaceutical and health sector, with a satisfactory yield. The essential oil from *Aloysia hatschbachii*

predominantly consists of sesquiterpenes such as β -Elemene and Germacrene B, but also has monoterpenes and phenylpropanoids, though in lower concentrations. It can be concluded that the species *Aloysia hatschbachii* presents characteristics of the botanical genus *Aloysia*, such as the presence of trichomes, with characteristics of non-deciduous leaves and phenology influenced by climatic variables, and production of essential oil with high concentration of sesquiterpenes (above 84%) and its potential antimicrobial action.

Keywords: Cidr3. Endemic. Phenophases. Secondary metabolite.

LISTA DE FIGURAS

- ARTIGO I:**.....
- Figura 1** - Ocorrência em habitat natural da espécie *Aloysia hatschbachii*. a – Imagem aérea (GOOGLE EARTH), localização (26°09'21"S; 49°25'19"W; 824 MSL) no município de Piên – Paraná, localidade Rincão dos Maia. b – Relevo do local ondulado/forte ondulado e bastante acidentado, solo pouco profundo, com presença de mosqueados de 10-20 cm. c – Área com a presença da espécie *A. hatschbachii*, utilizada atualmente como pastagem natural. d – Característica de ocorrência da espécie *A. hatschbachii*, geralmente próximo a formação rochosa, com sistema radicular aprofundando-se até 10-20 cm.....29
- Figura 2** - Morfoanatomia foliar de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Folha incompleta, peciolada, simples, disposição opostas cruzada (predominantemente) de consistência cartácea. **(b)** Face adaxial áspera, limbo com margem serrada ao longo da metade apical, com nove pares de dentes, ápice agudo a obtuso, basalmente cuneada, não dentada e decorrente no pecíolo, densamente pilosa e de forma elíptica. **(c)** Face abaxial apresentando venação peninérveas com nervuras secundárias e pseudosecundária, de cor castanho-avermelhado em folhas em processo avançado de maturação, nervuras bem evidentes, com tricomas tectores evidentes na nervura principal e margens revoluta. **(d-e)** – Fotos de microscopia eletrônica de varredura das faces adaxial e abaxial (respectivamente), evidenciando tricomas tectores (Tt) de parede lisa, unicelular, com células basais distribuídas radialmente em torno do tricoma, tricoma glandular (Gt) e grânulos de cera epicuticular (Cc). **(f-g)** Diafanização de folhas evidenciando a face adaxial e abaxial (respectivamente), com tricomas tectores unicelulares (Tt) com cistólito na base, e tricomas glandulares (Gt); Células epidérmicas curvas. **(h, i, j, k, m)** Cortes transversais de folha evidenciando o mesófilo foliar dorsiventral. **(h)** Limbo foliar com nervura central plano convexa, com células epidérmicas (Me) de dois estratos, parênquima paliçádico (Pp) com dois ou até três estratos, células xilemáticas (Xy), células floemáticas (Ph), fibras esclerenquimáticas (Sc) e parênquima lacunoso (Lp). **(i)** Corte transversal evidenciando a face adaxial, com tricoma glandular (Gt) de cabeça unicelular e haste multicelular (bicelular), células epidérmicas (Me) com um ou até dois estratos de células e parênquima paliçádico (Pp) com dois ou até três estratos de células. **(j)** Corte transversal evidenciando a face adaxial da folha com tricoma tector, com presença de cistólito (Cy). **(k)** Corte transversal evidenciando a face abaxial da folha, com parênquima lacunoso (Lp), câmara subestomática (Su) bem desenvolvida, estômato anomocítico (St), tricoma glandular (Gt) e tricoma tector (Tt) pluricelular. **(l)** Corte paradérmico evidenciando a face abaxial de folhas, com a presença de estômatos anomocíticos (Sa). **(m)** Corte transversal evidenciando o sistema vascular, com células de xilema (Xy) e células de floema (Ph) circundados por fibras esclerenquimáticas (Sc). Barras: d – m: 50µm.30
- Figura 3** - Morfoanatomia do caule e raiz de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Morfologia de *Aloysia hatschbachii*, arbusto com cerca de 0,90 m de altura, demonstrando hastes de cor marrom-avermelhada, com diversas ramificações. **(b)** Ápice de haste com coloração verde intensa (tecidos jovens) e emissão de gemas laterais próximo ao nó. **(c)** Secção de haste pubescente (densa cobertura pilosa), transição de coloração marrom-avermelhada para coloração verde em hastes em desenvolvimento (estruturas jovens). **(d)** Corte longitudinal de haste evidenciando a anatomia interne, destacando a periderme (Ep), parênquima medular (Mp) ao centro e vasos condutores na sequência, xilema (Xy) e floema (Ph). **(e)** Corte transversal de secção de haste evidenciando o estado do órgão, com parte do súber da periderme destacando-se da parte interna do caule. **(f)** Corte transversal da haste evidenciando a anatomia do órgão, com parênquima medular (Mp) central, xilema (Xy) e floema (Ph) e fibras esclerenquimáticas (Sc) formando feixes distribuídos em toda a circunferência do caule. **(g)** Detalhe do corte transversal do caule, evidenciando a presença

das fibras esclerenquimáticas (Sc) com parede secundária bem espessa, xilema (Xy) e floema (Ph). **(h)** Secção de raiz principal e ramificações de raízes laterais. **(i)** Corte longitudinal da raiz evidenciando o xilema (Xy), cambio vascular (Ca) e a epiderme (Ep), tecido localizado na extremidade do corte. **(j)** Corte transversal do caule evidenciando o xilema (Xy) ao centro, com raios parenquimáticos (Rp) projetados do centro em direção ao câmbio vascular, floema (Pf) externamente ao câmbio vascular e periderme (Pr) externamente ao corte. Barras: d, f, g, i, j: 50µm; c, e, h: 500 µm.37

Figura 4 - Morfoanatomia da inflorescência de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Inflorescência distribuída por toda a planta. **(b)** Detalhe morfológico aproximado de inflorescência do tipo racemo (pedunculada e pedicelada), com flor cíclica. **(c)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a forma de abertura das flores do tipo indefinida, composta, axilares e terminais. **(d)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a flor diclamídea, heteroclamídea; cálice de cor verde, gamossépalo e tetrâmero; corola de cor branca, gamopétala, tetrâmera e actinomorfa. **(e)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a flor do tipo hermafrodita, isostêmone, hipógina. **(f)** Detalhe morfológico aproximado da simetria floral do tipo actinomorfa. **(g; h)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando o androceu dialistêmone, filete de ramificação simples, anteras livres entre si, didínamo e estames epipétalos; deiscência introrsa. **(i)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a antera diteca, deiscência da antera (abertura) longitudinal e (posição) introrsa. **(j)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando o grão de pólen, de forma ovóide, agrupados ou isolado. **(k)** Corte longitudinal anatômico de flor, evidenciando o ovário súpero (Os), gineceu gamocarpelar, bicarpelar, estilete (E) terminal, estigma indiviso, bilocular e placentação axial; Anteras (A), pétalas (Pt) e sépalas (Sp) de flor; inserção do filete na antera do tipo dorsifixa (Df). **(l)** Corte transversal anatômico da antera, detalhando o saco polínico (Pb), exotécio (Ex) e endotécio (En) da antera e grão de pólen (Pg) no interior do saco polínico. **(m)** Corte transversal anatômico da flor evidenciando o estilete (E), duas anteras adultas (A) e feixe líbero-lenho (Be) da antera. **(n)** Corte transversal anatômico evidenciando o ovário bilocular. **(o)** Detalha morfológico aproximado do fruto seco do tipo esquizocarpo. **(p)** Corte longitudinal anatômico do ovário evidenciando o tipo de placentação axial (Ap) ligado ao falso septo (Fs). Barras: d, e, f, g, h, i, o: 500 µm; j, k, l, m, n, p: 50 µm.40

ARTIGO II:.....

Figure 1 - Meteorological variables for the period of phenological assessments (August 2018 to October 2019) of species *Aloysia hatschbachii* (P mm = cumulative monthly precipitation) T °C = average monthly air temperature; RH % = average monthly relative humidity; MJ m² = average incident monthly global solar radiation).53

Figure 2 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for budding (a) and mature leaves (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.56

Figure 3 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for flowering (a) and fruiting (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.57

Figure 4 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for leaf fall (a) and leaf senescence (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.58

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I:	
Tabela 1 - Densidade média de tricomas glandulares e tectores da face foliar adaxial e abaxial de plantas de <i>Aloysia hatschbachii</i> , analisados em diferentes porções da planta.....	34
Tabela 2 – Densidade média de tricomas glandulares e tectores por mm ⁻² da face foliar adaxial de plantas de <i>Aloysia hatschbachii</i> , analisados em diferentes porções da planta.	35
ARTIGO II:	
Table 1: Pearson correlation between meteorological variables and phenological phases, for index of activity. (T = average monthly air temperature; m T = minimum monthly air temperature; M T = maximum monthly air temperature; RH = average monthly relative humidity; SR = average incident monthly solar radiation; bu = budding; fl = flowering; fr = fruiting; lf = leaf fall; ls = leaf senescence).	59
Table 2: Pearson correlation between meteorological variables and phenological phases, for percent index of intensity. (T = average monthly air temperature; m T = minimum monthly air temperature; M T = maximum monthly air temperature; RH = average monthly relative humidity; SR = average incident monthly solar radiation; bu = budding; ml = mature leaves; fl = flowering; fr = fruiting; lf = leaf fall; ls = leaf senescence).	59
ARTIGO III:	
Tabela 1 - Teor (%) de óleo essencial em quatro amostras de <i>Aloysia hatschbachii</i> (P-1, P-2, P-3 e P4) cultivadas condições de estufa em Frederico Westphalen-RS (2018-2019).....	71
Tabela 2 - Constituintes químicos do óleo essencial (%) em quatro amostras de <i>Aloysia hatschbachii</i> (P-1, P-2, P-3 e P-4) cultivadas em condições de estufa em Frederico Westphalen-RS (2018-2019).	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA VERBENACEAE	16
2.2 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO <i>Aloysia</i>	17
2.2.1 Aspectos gerais da espécie <i>Aloysia hatschbachii</i> (Moldenke).....	17
2.3 IMPORTÂNCIA DA DESCRIÇÃO ANATÔMICA E MORFOLOGICA DE PLANTAS AROMÁTICAS	18
2.4 APLICABILIDADE DA FENOLOGIA EM PLANTAS AROMÁTICAS	18
2.5 PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.5.1 Impactos e importância do óleo essencial.....	20
3 ARTIGO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE <i>Aloysia hatschbachii</i>: UMA ESPÉCIE AROMÁTICA ENDÊMICA DO ESTADO DO PARANÁ.....	22
3.1 RESUMO	22
3.2 ABSTRACT.....	22
3.3 INTRODUÇÃO.....	23
3.4 METODOLOGIA.....	25
3.4.1 Material vegetal	25
3.4.2 Morfologia vegetal	26
3.4.3 Anatomia de luz	26
3.4.4 Microscopia de varredura.....	27
3.4.5 Índice e densidade de tricomas.....	28
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.5.1 Descrição do local de origem da espécie	29
3.5.2 Morfoanatomia de folha.....	30
3.5.3 Morfoanatomia de ramos.....	36
3.5.4 Morfoanatomia de raiz.....	39
3.5.5 Morfoanatomia de flor e fruto.....	40
3.6 CONCLUSÃO.....	42
3.7 AGRADECIMENTO.....	43
3.8 REFERÊNCIAS	43
4 ARTIGO II - FENOLOGIA DE <i>Aloysia hatschbachii</i> SOB CULTIVO EM REGIÃO SUBTROPICAL	49
4.1 ABSTRACT	50
4.2 RESUMO	50
4.3 INTRODUCTION	51
4.4 MATERIAL AND METHODS	52
4.4.1 Characteristics of the study site	52
4.4.2 Phenological observations.....	53
4.5 RESULTS	55
4.6 DISCUSSION.....	60
4.7 CONCLUSION	61
4.8 REFERENCES	62
5 ARTIGO III - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aloysia hatschbachii</i> MOLDENKE.....	66

5.1 RESUMO:	66
5.2 ABSTRACT:.....	66
5.3 INTRODUÇÃO.....	67
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	69
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.6 CONCLUSÃO.....	75
5.7 AGRADECIMENTO.....	76
5.8 REFERÊNCIA	76
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
7 CONCLUSÃO GERAL.....	84
8 REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que existam entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas no mundo, das quais menos de 20% foram ou estão sendo investigadas. Campeão absoluto de biodiversidade terrestre, o Brasil reúne quase 12% de toda a vida natural do planeta, concentrando 55 mil espécies de plantas superiores (22% do total mundial), muitas delas endêmicas. Isto ocorre porque o país apresenta regiões com diferentes zonas climáticas, variando entre trópico úmido, semiárido e áreas temperadas, o que gera diversas zonas biogeográficas (ANDREOLI et al., 2014).

O Estado do Paraná apresenta atualmente menos de 5% da cobertura original (SANTO JUNIOR, 2008), e desta cobertura, destaca-se a Mata Atlântica que se diferencia das demais formações florestais pela heterogeneidade na sua biodiversidade, sendo considerado um ecossistema frágil pois, na sua maioria, está sobre solos inférteis e lixiviados.

Diversas espécies originárias de ambientes endêmicos, como a Mata Atlântica, estão seriamente ameaçadas de extinção (SANTOS, 2010). Entre elas está a *Aloysia hatschbachii*, que habita solo com afloramentos rochosos e próximos às escarpas da Serra Geral, sendo classificada como endêmica da região Sul do Paraná. É considerada pela CNCFlora como espécie em perigo de extinção por apresentar risco muito elevado de extinção na natureza, tendo em vista sua restrita área de ocupação e o alto grau de ameaça que seu ambiente natural tem sofrido pela intensa atividade florestal e agrícola.

Os registros de coleta da *Aloysia hatschbachii* Moldenke se encontram no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, com base no material coletado pelo botânico Gerdt Guenther Hatschbach, realizada em março de 1967, no município de Piên/Paraná (Brasil). Atualmente, poucos registros desta espécie são encontrados para outras região, apesar de Crespam (2010) mencionar a espécie como pertencentes da flora do estado do Rio Grande do Sul. No entanto, dados de ocorrência para este estado são confusos, pois são citados como espécie de nova ocorrência, observado no Parque do Caracol, cidade de Canela (CRESPAM, 2010).

Aloysia hatschbachii é uma planta aromáticas e, como muitas outras espécies deste gênero botânico (Verbenaceae), possui potencial para produção de óleo essencial. Devido a essa potencialidade, a espécie passa a ter grande importância para a pesquisa, visando o isolamento de variados constituintes com novas propriedades biológicas.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2010), a intensificação em pesquisas que visam a busca de melhor aproveitamento dessa biodiversidade é fundamental para a conservação genética e essencial aos setores agrícolas. Um exemplo da aplicabilidade dessa biodiversidade é a utilização de extrativos vegetais, porém esse conhecimento, em muitos casos, é apenas empírico. O aumento no uso de medicamento a base de plantas e o conhecimento popular, enfatiza a necessidade de pesquisas quanto aos efeitos, seja eles benigno ou maligno, para assegurar o uso destes, incentivando o estudo etnobotânico e etnofarmacológico, agregando informações sobre a biodiversidade das plantas que o país apresenta (FIRMO et al., 2012).

O Brasil possui uma das maiores diversidades genética do mundo, necessitando desta forma, estabelecer estratégias de conservação das espécies, ou seja, a manutenção e recuperação de populações em risco de extinção. A caracterização morfológica e anatômica fornece informações básicas e de extrema importância para auxiliar na correta identificação e conservação de espécies. Aliado a essas características, acrescenta-se a importância do registro das características fenológicas, pois este serve como indicador das respostas das plantas e suas relações direta com as condições climáticas e ao seu caráter adaptativo. A espécie *Aloysia hatschbachii* é pouco conhecida e, considerando o fato de que a espécie em questão ainda é pouco estudada, pesquisas tornam-se relevantes, tanto para ciência, contribuindo com o acervo científico da espécie, quanto para o setor agrônomo, onde representa alternativa de cultivo. Diante desses fatores, criou-se hipóteses, como:

A espécie *Aloysia hatschbachii* apresenta características morfoanatômicas que condizem com aquelas da descrição do gênero botânico, tais como aromáticas e células especializadas em produção/armazenamento de óleo essencial;

A fenologia permitirá identificar os períodos em que *Aloysia hatschbachii* apresenta disponibilidade de folhas para obter material vegetal para coleta e extração do óleo essencial, além de definir as variáveis meteorológicas envolvidos no ciclo desta espécie e um possível cultivo no Rio Grande do Sul;

Os constituintes identificados no óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* permitirão definir possíveis potenciais de utilização, servindo como informação preliminar para futuros testes avaliando as suas atividades biológicas.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfoanatômicas, fenológica e composição química do óleo essencial de plantas de *Aloysia hatschbachii*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPESCTOS GERAIS DA FAMÍLIA VERBENACEAE

A família Verbenaceae (Angiosperma) possui distribuição Pantropical, porém, principalmente neotropical, contemplando cerca de 100 gêneros e 2.600 espécies (PORTMANN et al., 2012). É composta por ervas ou arbustos, árvores ou lianas, em muitos casos aromáticas. São espécies ornamentais (*Petrea volubilis*), cerca viva (*Durante repens*), algumas espécies consideradas invasoras (gênero *Verbana*) e árvores comuns no cerrado e campos rupestres (*Citharexylum myrianthum*). De aspectos gerais, os ramos geralmente quadrangulares; folhas opostas e simples, com margens serreadas; inflorescência racemosa; flores bissexuadas, cálice geralmente pentâmero e gamossépalo, assim como a corola, pentâmera e gamopétala; ovário supero e bicarpelar, dividido por falso septo; fruto do tipo drupa ou esquizocarpo (SOUZA & LORENZI, 2012).

No Brasil, a família reúne a maior riqueza, com cerca de 16 gêneros e próximo de 300 espécies, sendo que destas, 191 ocorrem de forma endêmica, distribuído nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (SOUZA & LORENZI, 2012; SALIMENA et al., 2015). As plantas desta família são muito utilizadas no Brasil, sendo as espécies *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., *Stachytarpheta cayannensis* (Rich.) Vahl. e *Lantana camara* L. entre as mais citadas e os gêneros que apresentaram maior número de espécies são *Lippia* spp., *Lantana* spp., *Stachytarpheta* spp., *Aloysia* spp., e *Verbana* spp. citados em uma revisão bibliográfica sobre o uso na medicina popular de espécies da família (SANTOS et al., 2015). Alguns representantes da família Verbenaceae apresentam propriedades farmacológicas, as quais podem ser utilizadas em tratamentos de infecções bacterianas, fúngicos, malária, artrite, entre outras e merecem um estudo mais detalhado, podendo levar a descobertas de novas drogas eficazes (RAHMATULLAH et al., 2011). O gênero *Lippia* é exemplo de fonte possível de alternativa de medicamento, podendo assim ser mais explorada devido a composição de seus fitoquímicos como flavonoides, fenóis e terpenóides (OMBITO et al., 2014).

A utilização no Brasil é a mais variada possível, desde a medicina popular, fármacos, homeopatia animal, indústrias de perfumarias, aromatizantes, entre outros. A característica aromática dos gêneros *Aloysia* e *Lippia*, com notória distribuição no território nacional,

atribuem a estas espécies grande importância na medicina tradicional e popular no país (RICCO et al., 2010).

2.2 ASPESCTOS GERAIS DO GÊNERO *Aloysia*

O gênero *Aloysia*, compreende principalmente arbustos aromáticos e apresenta cerca de 30 espécies, as quais estão distribuídas nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos da América até o centro da Argentina (ROJAS et al., 2012), sendo seis destas espécies endêmicas do Brasil, entre elas a *Aloysia hatschbachii* Moldenke (MORONI & O'LEARY, 2015). O gênero é anfitropical nativo de regiões áridas, temperadas e subtropicais. Pode ser encontrado em altitudes que variam desde o nível do mar até altitudes próximas de 4000 metros, na Cordilheira dos Andes.

A fitoquímica do gênero demonstra, principalmente, a presença de óleos essenciais, no qual numerosos monoterpenos e sesquiterpenos já foram mencionados em algumas espécies deste gênero, sendo amplamente utilizados na cultura popular para fins culinários e medicinais.

2.2.1 Aspectos gerais da espécie *Aloysia hatschbachii* (Moldenke)

A *Aloysia hatschbachii*, planta da família Verbenaceae, nativa do Brasil, no qual primeiramente foi descoberta na cidade de Piên, no estado do Paraná, em solo com características rochosas e próximos às escarpas da Serra Geral, é considerada uma espécie endêmica da região (SEGECIN, 1995; SIEDO, 2006; MÚLGURA, 2007; LU-IRVING et al., 2014). Nesta região suas folhas são utilizadas como condimento para temperar carnes.

Segundo CRESPAM (2010) a espécie também foi encontrada no Rio Grande do Sul, assim sendo configurada como espécie de nova ocorrência no estado, na cidade de Canela, porém sem localização precisa, ocorrendo em pequenas manchas arbustivas, capões e florestas de araucária. Além destas localizações, uma possível ocorrência pode ser citada ao norte do Pará (MORONI & O'LEARY, 2010).

Algumas características facilitam a identificação da espécie, pois a venação pinada de cor marrom-avermelhada na superfície abaxial das folhas é uma característica marcante da mesma (O'LEARY et al., 2016). É similar a *Aloysia lycioides*, diferenciando-se apenas por suas folhas opostas com lâminas esclerófilas, margens serrilhadas da metade apical acima e nervuras da face abaxial marrom-escuro. Apresenta característica arbustiva, entre 1-2 metros

de altura, inflorescência de cor branca a roxo-claro (SIEDO, 2006). Devido as características da inflorescência, flores, cálice e folhas *Aloysia hastchbachii* pode ser relacionada a *A. polygafolia*, *A. brasiliensis*, *A. cordatae* e *A. chamaedryfolia*.

O nome da espécie *hatschbachii* é em homenagem ao botânico Gerdt Hatschbach, ex-diretor do Museu Botânico Municipal de Curitiba (SEGECIN, 1995). Considerando o fato de que a espécie em questão ainda é pouco estudada e possui potencial fitoterápico, pesquisa a seu respeito tornam-se imprescindível, desde a manutenção e conservação da espécie, pois esta apresenta-se em risco de extinção, assim garantindo a propagação da espécie.

2.3 IMPORTÂNCIA DA DESCRIÇÃO ANATÔMICA E MORFOLOGICA DE PLANTAS AROMÁTICAS

A descrição anatômica é um dos aspectos mais importantes para plantas aromáticas com potencial econômico, tendo em vista que pode elucidar as estruturas responsáveis por secreções dos metabólitos de interesse (SVOBODA; SVOBODA; SYRED, 2000). Essas estruturas são adaptações evolutivas do mesofilo foliar para fora, para a epiderme e seus tricomas e para dentro da planta, em direção ao floema e xilema (FAHN, 2002). Além disso, a descrição anatômica e morfológica dessa classe de plantas pode auxiliar na escolha da estrutura do vegetal para realizar a extração, bem como o método adequado, desde coleta, até secagem do material vegetal, pois algumas espécies sintetizam e acumulam as substâncias em tricomas, como é o caso de Asteraceae, Lamiaceae e Verbenaceae, assim, caso submetido a um processo de secagem inapropriado, pode ocorrer a volatilização destes compostos, comprometendo o rendimento do óleo essencial (MONTANARI, 2010).

A proposta de alguns autores é que estruturas secretoras e a posição destas nos órgãos foliares apresenta valor diagnóstico em nível genérico, o que permite identificação do gênero Asteraceae a partir de uma chave baseada em estruturas secretoras e a posição onde encontram-se (CASTRO; LEITÃO-FILHO; MONTEIRO, 1997), assim, as descrições morfológicas e anatômicas vão desde a facilidade na identificação de possíveis plantas com tais potenciais, até a identificação da espécie dentro de um gênero.

2.4 APLICABILIDADE DA FENOLOGIA EM PLANTAS AROMÁTICAS

A fenologia, responsável em registrar cronologicamente as diferentes fases de desenvolvimento de plantas e correlacioná-las com as condições climáticas por um longo

período, permite conhecer períodos em que ocorrerão determinada fase e sua respectiva duração, além de auxiliar a mensurar a probabilidade de ocorrência e apresenta grande interesse nas áreas da biologia, agricultura e agrometeorologia (FIALLO et al., 2001), até mesmo pelo fato de mudanças climáticas influenciarem na expressão das fases fenológicas, o que faz do ramo da fenologia, atualmente, uma área de grande interesse devido a influência que tal fator pode acarretar sobre as espécies.

Em plantas aromáticas, os ciclos fenológicos podem servir como informação básica para identificar a melhor fase para a coleta, por exemplo, como o conteúdo de metabólitos secundários contidos nas plantas (variação sazonal), além do período de ocorrência das fases dos diferentes órgãos da planta de cada espécie que podem ser coletados e posteriormente extraídos o óleo essencial (OE) e material de propagação (sementes). Desta forma, para melhor manejo, recomenda-se estudos fenológicos em condições de cultivo para que a identificação das fenofases facilite o cultivo destas plantas (FUENTES, 1992) e assim permita que as coletas sejam em períodos adequados de desenvolvimento das plantas. Ainda, estudos recentes indicam um efeito tanto do período de crescimento como condições de estresse na planta que influenciam na síntese dos metabólitos secundários (LI et al., 2020), ou seja, uma sazonalidade da composição do óleo essencial de plantas devido a vários fatores como de desenvolvimento, que está ligado a fenofase, além de condições de estresse que estão ligados as variáveis climáticas.

2.5 PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas apresentam mecanismos de defesa a herbívoros e patógenos, com cutícula e a periderme atuando como linha de frente de defesa, ou seja, primeiro nível de defesa. Porém, algumas plantas contam com um segundo mecanismo de defesa, conhecido como metabolismo secundário. Esses metabolitos atuam na proteção contra herbívoros e infecção por patógenos, atrativos (odor, cor ou sabor) e/ou atuam como agentes na competição planta-planta (alelopatia) (TAIZ & ZEIGER, 2013). O conteúdo e a composição do óleo essencial é um resultado da interação planta e ambiente, além de condições intrínsecas da planta, como a influência das fases de crescimento e ambiente (estresse). O que autores como como Li et al. (2020) tem buscado, é a compreensão de quais mecanismos reguladores que influenciam na síntese destes compostos, assim elucidar as alterações que ocorrem nas vias metabólicas, para assim chegar a um suporte teórico que facilite em questões como seleção de regiões para cultivo ou a síntese de metabolitos secundários de interesse.

A maior classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas são os terpenos, os quais são sintetizados a partir da acetil-CoA ou intermediários glicolíticos e são classificados pelo número de unidade de cinco carbono, como os monoterpenos (possui duas unidades C₅), sesquiterpenos (três unidades C₅), diterpenos (quatro unidades C₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀). Devido ao baixo peso molecular (como em monoterpenos e sesquiterpenos), costumam ser substâncias voláteis, assim chamados de óleos essenciais (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Esses metabólitos secundários são sintetizados ou acumulados e eliminados em células especializadas, as quais podem ocorrer de forma isoladas como idioblastos secretores ou estruturas diferenciadas, conhecidos como tricomas, emergências, bolsas, canais e laticíferos (ASCENSÃO, 2010) e essas estruturas apresentam grande importância em diagnósticos anatômicos em Angiospermas (CASTRO; LEITÃO-FILHO; MONTEIRO, 1997).

A utilização de plantas aromáticas, em muitos casos se tornam um risco. A *Aloysia citriodora*, conhecida como verbena limão, segundo a medicina popular, é um bom ansiolítico, hipnótico, agente antiespasmódico gastrointestinal, porém nenhum dos efeitos citados foram avaliados clinicamente, sendo apenas a ação antioxidante comprovada em estudos realizados com humanos, fazendo assim, investigações com uso humano uma lacuna a ser preenchida (BAHRAMSOLTANI et al., 2018).

2.5.1 Impactos e importância do óleo essencial

Em 2016 o mercado global de óleo essencial movimentou US \$ 71,19 bilhões, com um crescimento previsto, este, devido ao aumento da preferência ao consumo de medicamentos tradicionais que não causem toxicidade e apresentem menos efeitos colaterais (MRR, 2017). No Brasil, o emprego de plantas como medicamentos é bastante difundido, porém, em muitos casos, sem comprovação científica. O conhecimento etnobotânico acaba despertando o interesse das ciências, elaborando trabalhos nesta área, consagrando o uso destes princípios ativos (OLIVEIRA & AKISUE, 2009). Mas não bastando, também despertando o interesse de outras áreas, tanto na pesquisa, como na parte econômica. Essas pesquisas são voltadas a aplicabilidade em homeopatia animal, indústrias de produtos de higiene e perfumaria, entre outros.

O Brasil é um dos países em destaque na produção de óleo essencial devido a produção de óleo essencial de laranja, subproduto da indústria de suco. Além da laranja, são cultivadas espécies aromáticas como a camomila, gengibre, capim-limão, maracujá, menta,

melissa, calêndula, entre outras. Esse cultivo tem se expandido, resultado da elevada demanda de mercado, associado a estímulo de uma agricultura sustentável assistido por empresas de assistência técnica do estado, fazendo do Brasil um potencial centro de produção, sendo o estado do Paraná o maior produtor brasileiro de óleo essencial, atendendo 90% da demanda nacional por plantas aromáticas (CORRÊA JÚNIOR & SCHEFFER, 2014). Deste modo, o destaque brasileiro neste ramo, torna pesquisas envolvendo plantas aromáticas com elevado fator de impacto na sociedade, contribuindo significativamente para formas alternativas de uso e aplicabilidade de óleos essenciais.

3 ARTIGO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE *Aloysia hatschbachii*: UMA ESPÉCIE AROMÁTICA ENDÊMICA DO ESTADO DO PARANÁ

3.1 RESUMO: A *Aloysia hatschbachii*, de origem brasileira, endêmica no estado do Paraná, encontra-se em risco de extinção, além disso as informações na literatura sobre a espécie são muito restritas. Considerando a importância de parâmetros morfoanatômicos para auxiliar no conhecimento das espécies, bem como na taxonomia, para facilitar a identificação das mesmas, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização das estruturas morfológicas e anatômicas de *Aloysia hatschbachii* para contribuir com a identificação da espécie. Cortes histológicos de seções vegetais para realizar a anatomia, foram realizados a partir de inclusão dos tecidos em historesina e submetidos ao processo de corte histológico transversal, longitudinal e paradérmico, com 5 µm de espessura com o auxílio de um micrótomo de corte histológico, acomodados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina. Após, foi realizado capturas de imagens em microscópio com câmera acoplada de ambos os procedimentos. Fotos da planta a campo, para a morfologia, foram realizadas com o auxílio de uma máquina fotográfica digital. A *Aloysia hatschbachii*, planta arbustiva, apresenta folhas do tipo cartácea, hipostomática, com epiderme multiseriada, densa cobertura de cera epicuticular e tricomas tectores e glandulares, com mesofilo dorsiventral. O caule, de coloração verde a marrom-avermelhado, apresenta feixes de fibras esclerenquimáticas de sustentação, quando preenchido com parênquima medular apresenta reserva de amido. As peças florais do perianto também apresentam densa cobertura pilosa, com ovário súpero e óvulos ligado ao falso septo, característica marcante de Verbenaceae. A espécie *Aloysia hatschbachii* apresentou características aromáticas e morfoanatomias presentes no gênero botânico *Aloysia*.

Palavras-chave: Anatomia, Cidrô, Morfologia, Verbenaceae.

MORPHOANATOMIC CHARACTERIZATION OF *Aloysia hatschbachii*: AN AROMATIC SPECIE ENDEMIC TO PARANÁ STATE

3.2 ABSTRACT: Originally from Brazil and endemic to Paraná state, species *Aloysia hatschbachii* is at risk of extinction and, in addition to that, information in literature about this species is very limited. Given the importance of morphoanatomical parameters to help improve knowledge about different

species and to contribute information to taxonomy, this study aims to characterize the morphological and anatomical structures of *Aloysia hatschbachii* to help identify the species. Histological sections of plant tissue were prepared by embedding the tissues in HistoResin and obtaining transverse, longitudinal and paradermal cuts 5 µm in thickness with the help of a histological microtome. The sections were placed on glass slides and stained with toluidine blue. Microscope images of the procedures were captured using an attached camera. For the morphological description, on-site pictures of plant individuals were taken using a digital camera. The leaves of shrub-like plant *Aloysia hatschbachii* were found to be papery, hypostomatic, having multilayered epidermis and dense epicuticular wax coating, as well as glandular and non-glandular trichomes, with dorsiventral mesophyll. The stem is green to reddish-brown in color, having bundles of sclerenchyma fibers for support, and a starch reserve when filled with pith parenchyma. The floral parts of the perianth are also densely covered with hairs, with superior ovary and ovules connected to a false dissepiment, which is a distinctive feature to the Verbenaceae. The specie *Aloysia hatschbachii* presented aromatic and morphoanatomical characteristics present in the botanical genus *Aloysia*.

Key Words: Anatomic, Cidró, Morphology, Verbenaceae.

3.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Aloysia* (Verbenaceae), distribuído pelas Américas, desde os Estados Unidos da América à Patagônia, contempla cerca de 30 espécies (SIEDO, 2006; ROJAS et al., 2012; O'LEARY et al., 2016) e apresenta grande diversidade em ampla área de ocorrência, com interesse potencial principalmente na produção de óleos essenciais, como é o caso das espécies *A. citriodora*, *A. gratissima*, *A. lycioides*, *A. virgata* e *A. polystachya*, com propriedades repelentes e antissépticas em seus óleos essenciais (SIEDO, 2006). As principais características deste gênero são arbustos lenhosos e bem ramificados, com folhas oposta, e em alguns casos alternadas, gemas axilares múltiplas, com florescências em forma de espigas do tipo cilíndricas espaçadas ou densas, com presença de brácteas (ROMERO et al., 2002).

A espécie *Aloysia hatschbachii* Moldenke tem origem brasileira (LU-IRVING et al., 2014), com registro de exemplares na região sul do estado do Paraná, mais precisamente nas cidades de Piên e Rio Negro, próximos às escarpas da Serra Geral, em solo com característica rochosa (SIEDO, 2006), considerada espécie nativa endêmica desta região (SEGECIN, 1995; MÚLGURA, 2007). Segundo a descrição botânica de Moldenke (1969) e os registros de coleta que constam no Herbário Darwinion obtidos pelo botânico Gerad Hatschbach, realizada em março de 1967 em campo pedregoso, a planta é arbustiva e apresenta cerca de

1,5 m de altura. A espécie leva o nome *hatschbachii* em homenagem ao botânico que a encontrou no Brasil, Gerad Hatschbach (SEGECIN, 1995). Uma característica marcante e que facilita o reconhecimento da espécie é a venação pinada de cor marrom-avermelhada na superfície abaxial das folhas (O'LEARY et al., 2016).

Crespam (2010) realizou levantamento sobre a família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, e a espécie *A. hatschbachii*, considerada antes endêmica do estado do Paraná, foi citada como de nova ocorrência no estado do Rio Grande do Sul a partir de materiais coletados em Canela, no Parque do Caracol e outra coleta sem local definido. Pode ocorrer na encosta inferior do nordeste do Rio Grande do Sul (RS), em pequenas manchas arbustivas, capões e em florestas de araucária. Segundo o autor, para a conclusão de que o material coletado se tratava da *A. hatschbachii* foi realizado a partir da observação do material tipo (TEX), coletado em Piên, Paraná. Porém, segundo Crespam (2010), em uma nova saída de campo, realizado no Parque do Caracol e arredores, não foi possível localizar a espécie novamente. A distribuição geográfica em ambiente natural confirmada, como citado anteriormente, é registrada somente no sul do Paraná, mas outra possível ocorrência é citada ao norte do Pará, de domínio fitogeográfico de Mata Atlântica e tipo de vegetação de campo de altitude (MORONI & O'LEARY, 2010; SALIMENA & MULGURA, 2015). É considerada pela CNCFlora como categoria de ameaça EN (em perigo) por apresentar risco muito elevado de extinção na natureza devido a possuir extensão de ocorrência menor que 5.000 km², área de distribuição restrita a dois municípios, com intensa atividade florestal e agrícola, sujeitos a queimada e pressão de espécies exóticas (CNCFLORA, 2012). Além de exemplares no Museu Botânico Municipal de Curitiba, e atualmente vem sendo cultivados exemplares na Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen, região noroeste do estado do RS.

Os caracteres anatômicos, tais como estrutura do mesofilo da folha, distância dos feixes vasculares, distribuição e tipos de tricomas, fornecem informações de elevada significância taxonômica (CELEP et al., 2014) e os caracteres identificados na morfoanatomia de frutos, sementes e plântulas são importantes informações para reconhecimento da espécie ainda a campo (SILVA et al., 2016). Estas identificações contribuem para a conservação da espécie, além de outros benefícios (SILVA & MÔRO, 2008) e aplicações como na propagação da espécie.

Já o conhecimento morfológico vai muito além de informações sobre a espécie, pois facilita a identificação entre espécies semelhantes do mesmo gênero, como ocorre com a *Aloysia hatschbachii*, a qual apresenta semelhança com outras espécies do gênero, por

exemplo quando comparada à *Aloysia lycioides*, distinguindo-se por apresentar folhas esclerófilas, margens revolutas e venação abaxial. Acredita-se que a *A. hatschbachii* esteja relacionada a *A. polygalifolia*, *A. brasiliensis*, *A. cordata* e *A. chamaedryfolia*, devido as características de inflorescência, flor, cálice e folhas (SIEDO, 2006; CRESPIAM, 2010).

A lâmina foliar da *Aloysia hatschbachii* apresenta algumas características marcantes, como folhas anfiestomático durante a fase cotiledonar e juvenil e hipostomático em folhas adultas e espessa cutícula (SEGECIN, 1995). Alguns locais como campos de altitudes apresentam várias espécies com folhas micrófilas e altamente esclerófilas que ocorrem em manchas de solo específicas, como é o caso da vegetação da Serra do Espinhaço, sudeste brasileiro, com domínio de ocorrência de espécies com folhas duras (RIBEIRO; CORRÊA; SOUSA, 2010). Esta é uma característica que confere às plantas benefícios fisiológicos como cutícula espessa capazes de reduzir a perda de água e ganho de calor (READ & SANSON, 2003), e margens revolutas com função importante de auxiliar a manutenção da umidade ou calor, funções importantes quando as plantas estão sob condições adversas (KLING & HAYDEN, 2005).

Pouco conhecida morfo-anatomicamente, a *Aloysia hatschbachii* apresenta potencial de produção de óleo essencial com interesse medicinal eminente, com base nas características já mencionadas do gênero. A caracterização, tanto anatômica quanto morfológica fomentam informações básicas de grande importância que até então são deficientes, mas que são de extrema importância pois auxiliam até mesmo a conservação de espécies em condições de perigo de extinção, como é o caso desta espécie. A anatomia de plantas do gênero *Aloysia* vem sendo estudada, tendo em vista a necessidade de se conhecer a estrutura interna dessas plantas para a correta utilização na agricultura e na indústria e para se conhecer, de forma adequada, as variações interespecíficas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização anatômica e morfológica de folhas, ramos, flores, fruto e sistema radicular da espécie *Aloysia hatschbachii*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

Os indivíduos utilizados para avaliação foram obtidos de uma planta matriz doados pelo Jardim Botânico de Curitiba (Paraná) para a Universidade Federal de Santa Maria, *Campus Frederico Westphalen* (RS) no ano de 2016. As plantas foram propagadas através da

técnica de estaquia em espuma fenólica, a partir de material coletado de uma planta matriz, durante o período de abril de 2018 e transplantados para vaso com capacidade de 40L de substrato após o enraizamento pleno (60 dias). Como material vegetal para todas as análises, foram utilizadas plantas adultas, com cerca de 1,00 m de altura, cultivadas na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, entre outubro e dezembro, para contemplar as fases reprodutivas. Além do mais, foi realizada uma saída a campo, para a cidade de Piên-PR para averiguar a situação da espécie em seu habitat natural e endêmico.

3.4.2 Morfologia vegetal

Para registrar a morfologia externa da *A. hatschbachii* (folhas, ramos, raízes, flores e frutos), foram realizadas fotografias das plantas, utilizando plano de fundo preto para melhor destaque das imagens fotográficas. Foram registradas imagens de planta inteira e órgãos importantes como inflorescências, ramos e folhas de forma separada. Para dar destaque a órgão de menor escala, como por exemplo, flores e fruto, foi utilizado estereomicroscópio, com aumento de até 4X, durante os meses de outubro de 2018 a janeiro de 2019, para assim contemplar as fases reprodutivas.

3.4.3 Anatomia de luz

Foram confeccionados cortes histológicos de folhas, caule, raiz e flor para realizar a caracterização de estruturas internas através da metodologia proposta por Carmello-Guerreiro (1995) de Inclusão de Histo-resina (Histo-resin, Leica) de tecido vegetal. As plantas apresentavam altura aproximada de 1,00 M. As coletas do material foram realizadas durante os meses de outubro de 2018 a janeiro de 2019, para assim contemplar as fases reprodutivas.

As secções de tecidos vegetais (folhas, ramos, raízes, flores e frutos) foram mantidos em tubos de Eppendorf® com volume de 1,5 mL e fixadas em FAA50 (ácido acético glacial, formaldeído, etanol 50%) por 24 a 48 horas. Após essa etapa, os tecidos vegetais foram submetidos a uma série etílica para estocagem (álcool etílico 30, 40, 50, 60 e 70 %) durante 45-60 minutos cada, seguido de mais uma série em álcool etílico 70 % e então estocados em ambiente controlado com temperatura de 4 °C.

A etapa subsequente de desidratação dos tecidos foi seguida de uma nova série etílica partindo de álcool etílico 70%, 80%, 90%, 96% e 100% (120 minutos cada) e posteriormente submetidos ao processo de pré-infiltração, com os tecido permanecendo por sete dias em

solução com álcool etílico 100% + Histoiresina líquida (Histoiresin, Leica Instruments, Heidelberg) (1:1), mantidos em ambiente controlado refrigerado (4°C). Para a etapa de infiltração, os tecidos foram mantidos em solução de Histoiresina líquida + pó ativador, durante sete dias, armazenadas em ambiente controlado refrigerado.

A última etapa, a polimerização, consiste em adicionar resina líquida + pó ativador + endurecedor, seguindo a indicação do fabricante. Para isso, a inclusão em metacrilato (Histoiresina, Leica) das secções vegetativa de plantas foi utilizado um molde de silicone do tipo “embedding mold”, formando blocos de resina + secções da planta e posteriormente, o molde foi armazenado em geladeira a -20 °C durante o período de 48 horas, sendo então transferido para estufa de ventilação forçada a 45 °C por cinco dias ou até o endurecimento da resina, formando o bloco. Os blocos com resina prontos para uso foram submetidos ao processo de corte transversal, longitudinal e paradérmicos com espessura de 5 µm com o auxílio do Micrótopo Deslizante (SM 200 R - Leica) histológico disponível no laboratório de Anatomia da Madeira da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen.

Os cortes histológicos foram acomodados em lâminas e corados com azul de toluidina, pH 4,0 (FEDER & O'BRIEN, 1968) por 10 minutos e após, realizando a captura de imagens com o auxílio de microscópio óptico Leica® (DM 1000 – Leica) com câmera acoplado (DFC 295 – Leica), com as imagens fotomicrografadas com *software* apropriado, destacando estruturas do material avaliados e assim caracterizando-os.

Para a técnica de diafanização (clareamento da folha), realizada a partir de folhas totalmente expandida, seguiu a metodologia utilizando o fixador de tecidos vegetais FAA (Formaldeído, ácido acético e álcool etílico), por 48 horas. O material vegetal foi mantido em álcool etílico 70 %, por 24 horas, seguido de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 e 10 %, por 2 horas cada, e hipoclorito de sódio (NaClO) a 10 e 5 %, por 8 horas cada, com seguida série etílica de 50, 70, 90 e 100 % por 1 hora cada. Após esta série etílica, o material foi mantido em álcool etílico + xilol nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, durante cinco minutos cada, posteriormente em xilol (2x) por 5 minutos para então o material ser corado com azul de toluidina (pH 4,0) e realizado a montagem da lâmina com Entellan®. Posteriormente, realizou-se a captura de imagens com o auxílio do fotomicroscópio relatado anteriormente.

3.4.4 Microscopia de varredura

Para a microscopia de varredura da lâmina foliar, secções de folhas totalmente desenvolvida (madura, coloração verde intensa), retirada do terceiro nó apical de *A. hatschbachii* foram transferidas para tubos de Eppendorf[®], imersos em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4%, sacarose 3% e 2,5 µM em solução tampão 0,1 M pH 6,8) (KARNOVSKY, 1965). Ambas as superfícies da folha foram examinadas com microscópio eletrônico de varredura com os resultados documentados com um sistema digital de captura de imagens acoplado ao microscópio eletrônico (ZEISS . LEO1230 VP).

3.4.5 Índice e densidade de tricomas e estômatos

Os estudos anatômicos de índice e densidade de tricomas e densidade de estômatos foram efetuados na região central de folhas totalmente expandidas, dividindo a planta em três porções (ápice, médio e inferior), avaliadas nas faces abaxial e adaxial, em delineamento de blocos casualizados, com 20 repetições, cada. A confecção das lâminas seguiu a técnica conhecida como *imprints* (WEYERS & JOHANSEN, 1985; CAMPOS et al., 2009), técnica de impressão da epiderme, que consiste em colocar uma gota de adesivo instantâneo universal (éster de cianocrilato) sobre uma lâmina de vidro. A parte de interesse da folha é pressionada sobre a lâmina, por 30 segundos, tempo suficiente para que o adesivo espalhe e seque, permitindo a impressão da epiderme na lâmina.

A partir das lâminas confeccionadas, buscando-se sempre a parte central da folha, foi realizado a captura de imagens com auxílio do fotomicroscópio relatado anteriormente, utilizando aumento de 40x [área de 298 x 223µm (0,0665 mm²)].

A determinação do índice (Eq. 1) e densidade (Eq. 2) de tricomas e a determinação do índice de estômatos (Eq. 3) foi realizado com auxílio do software AnatiQuant 2[®], a partir da contagem de células epidérmicas e tricomas, seguindo a equação:

$$\text{Índice de tricomas (ÍT)} = (T/CE) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Densidade de tricomas (DT)} = T/0,0665 \text{ mm}^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Índice de estômatos (ÍE)} = (E/CE) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que; T: número de tricomas, CE: número de células epidérmicas, E: número de tricomas.

Os dados de contagem foram tabelados e submetidos análise de variância e ao teste de médias de Tukey quando significativos, utilizando o software Genes (CRUZ, 2013).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

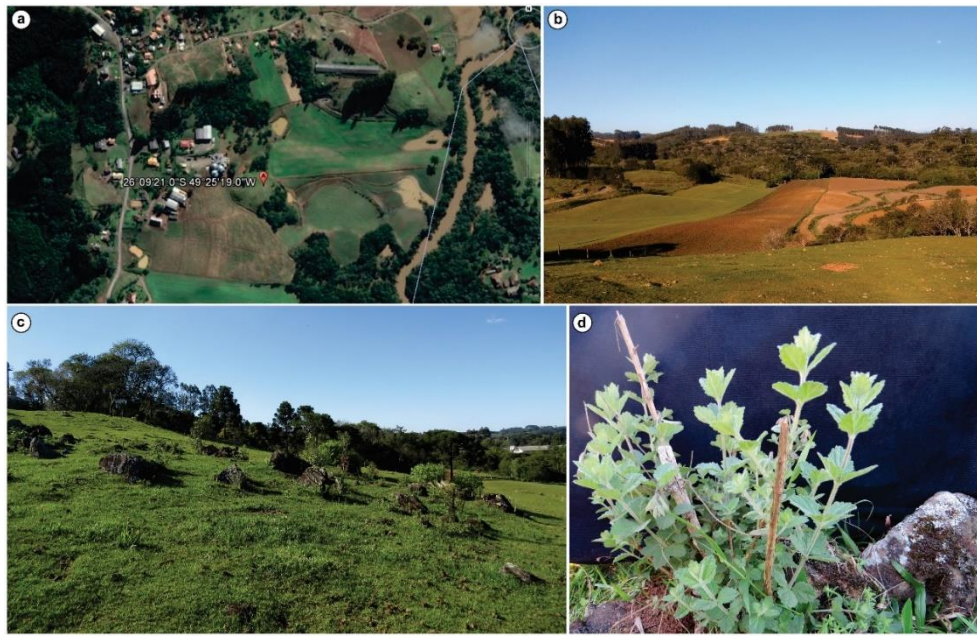
3.5.1 Descrição do local de origem da espécie

A cidade de Piên faz parte da região metropolitana de Curitiba e apresenta clima do tipo Cfb conforme a classificação de climática de Köppen, com temperatura média anual 17 °C (20,5 °C no mês de janeiro a 13 °C no mês de julho) e uma precipitação anual de 1.550 mm, concentrada na estação de verão, sendo julho e agosto os meses mais secos, com alguns veranicos (ALVARES et al., 2013). A região apresenta solo do tipo Cambissolo, Neossolo, Latossolo, entre outros e afloramento rochoso (EMBRAPA, 2012).

Em saída à campo, no município de Piên – PR, foi possível constatar a ocorrência da espécie *A. hatschbachii* (26°09'21"S; 49°25'19"W; 824 MSL) em solo rochoso e pouco profundo, classificado como Cambissolo Háptico Ta Distrófico. As plantas estavam sobre terreno acidentado e com presença de rochas na superfície do solo (Figura 1), geralmente com a presença da espécie muito próximas às formações rochosas (Figura 1d). A partir do laudo de análise física e química do solo, foi possível determinar a composição do solo predominantemente arenoso (53%), silte (10,8%) e argila (36,2%), com pH do solo próximo a 5,0, valor este abaixo do indicado para o cultivo de aromáticas. Os teores de argila (36,2%), matéria orgânica (2,7%) e CTC (10,0 Cmol L⁻¹) são considerados classe 3, média e média, respectivamente e teores de fósforo (3,2 mg/L), potássio (30,5 mg L⁻¹) e cálcio (1,0 mg L⁻¹) considerados baixos. Com isso, pode-se observar que plantas aromáticas apresentam certa tolerância a solos ácidos e pobres, porém respondem muito bem a calagem e adubação (SBCS, 2014).

Figura 1 - Ocorrência em habitat natural da espécie *Aloysia hatschbachii*. **(a)** – Imagem aérea (GOOGLE EARTH), localização (26°09'21"S; 49°25'19"W; 824 MSL) no município de Piên – Paraná, localidade Rincão dos Maia. **(b)** – Relevo do local ondulado/forte ondulado e bastante acidentado, solo pouco profundo, com presença de mosqueados de 10-

20 cm. **(c)** – Área com a presença da espécie *A. hatschbachii*, utilizada atualmente como pastagem natural. **(d)** – Característica de ocorrência da espécie *A. hatschbachii*, geralmente próximo a formação rochosa, com sistema radicular aprofundando-se até 10-20 cm.



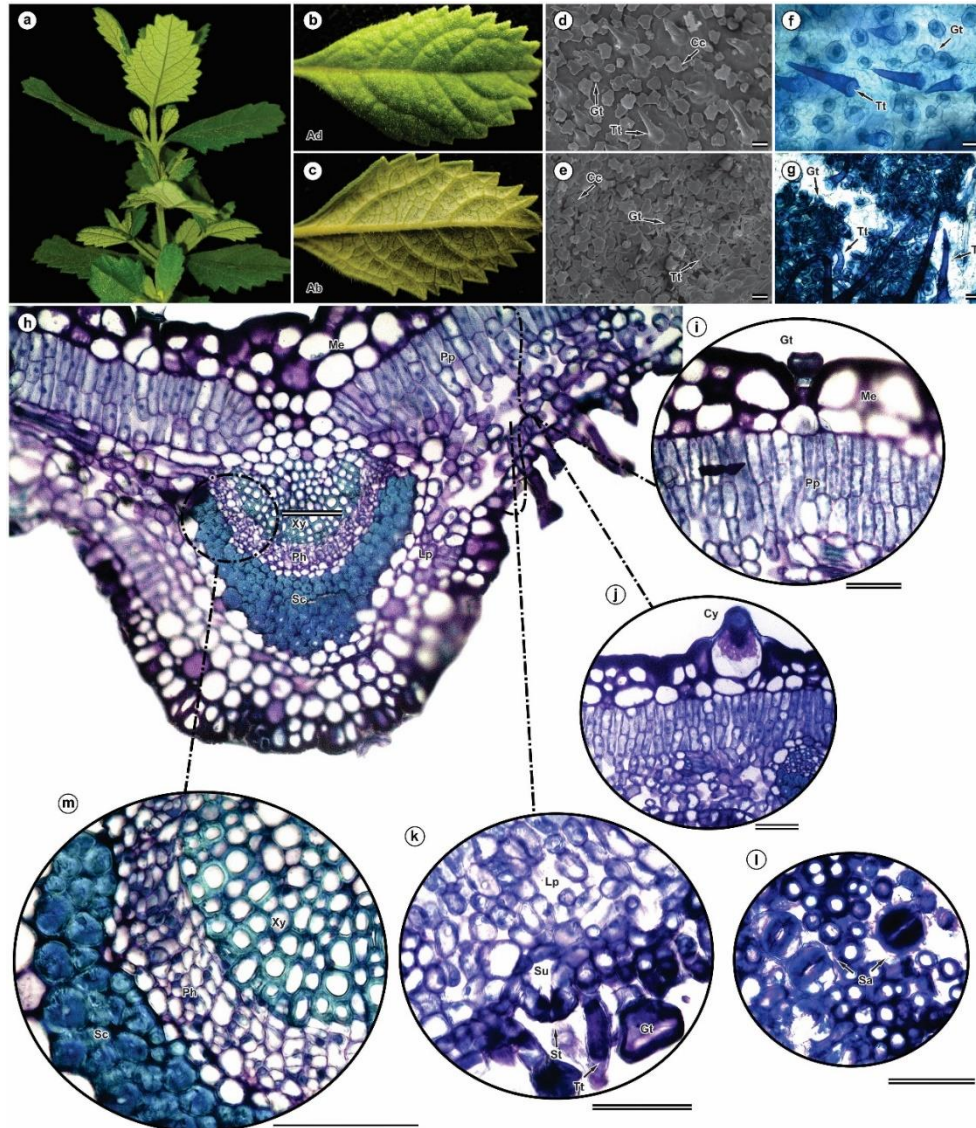
Fonte: Google Earth, Autor.

3.5.2 Morfoanatomia de folha

A morfoanatomia foi realizada a partir de material cultivado em Frederico Westphalen – RS, clima classificado como Cfa, sendo que em Piên - PR, o clima é considerado do tipo Cfb. As folhas de *Aloysia hatschbachii* são aromáticas, com padrão da disposição oposta cruzada (Figura 2a), porém não é unicamente presente, pois podem ser observadas uma disposição verticilada (Figura 3b), com três folhas por nó e margens revolutas. Assim, verifica-se que a espécie apresenta características gerais de acordo com o gênero botânico *Aloysia*, pois segundo Siedo (2012), esta espécie apresenta folhas preferencialmente oposta, as vezes alternadas e raramente verticiladas, com um pecíolo relativamente curto de aproximadamente 5-10 mm. A disposição verticilada, apesar de rara, é encontrada no gênero *Aloysia*, característica presente em *A. citriodora* (sinonímia *A. triphylla*), por exemplo, a qual apresenta três folhas por nó (GATTUSO et al., 2008).

Figura 2 - Morfoanatomia foliar de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Folha incompleta, peciolada, simples, disposição opostas cruzada (predominantemente) de

consistência cartácea. **(b)** Face adaxial áspera, limbo com margem serrada ao longo da metade apical, com nove pares de dentes, ápice agudo a obtuso, basalmente cuneada, não dentada e decorrente no pecíolo, densamente pilosa e de forma elíptica. **(c)** Face abaxial apresentando venação peninérveas com nervuras secundárias e pseudosecundária, de cor castanho-avermelhado em folhas em processo avançado de maturação, nervuras bem evidentes, com tricomas tectores evidentes na nervura principal e margens revoluta. **(d-e)** – Microscopia eletrônica de varredura das faces adaxial e abaxial (respectivamente), evidenciando tricomas tectores (Tt) de parede lisa, unicelular, com células basais distribuídas radialmente em torno do tricoma, tricoma glandular (Gt) e grânulos de cera epicuticular (Cc). **(f-g)** Diafanização de folhas evidenciando a face adaxial e abaxial (respectivamente), com tricomas tectores unicelulares (Tt) com cistólito na base, e tricomas glandulares (Gt); Células epidérmicas curvas. **(h, i, j, k, m)** Cortes transversais de folha evidenciando o mesófilo foliar dorsiventral. **(h)** Limbo foliar com nervura central plano convexa, com células epidérmicas (Me) de dois estratos, parênquima paliçádico (Pp) com dois ou até três estratos, células xilemáticas (Xy), células floemáticas (Ph), fibras esclerenquimáticas (Sc) e parênquima lacunoso (Lp). **(i)** Corte transversal evidenciando a face adaxial, com tricoma glandular (Gt) de cabeça unicelular e haste multicelular (bicelular), células epidérmicas (Me) com um ou até dois estratos de células e parênquima paliçádico (Pp) com dois ou até três estratos de células. **(j)** Corte transversal evidenciando a face adaxial da folha com tricoma tector, com presença de cistólito (Cy). **(k)** Corte transversal evidenciando a face abaxial da folha, com parênquima lacunoso (Lp), câmara subestomática (Su) bem desenvolvida, estômato anomocítico (St), tricoma glandular (Gt) e tricoma tector (Tt) pluricelular. **(l)** Corte paradérmico evidenciando a face abaxial de folhas, com a presença de estômatos anomocíticos (Sa). **(m)** Corte transversal evidenciando o sistema vascular, com células de xilema (Xy) e células de floema (Ph) circundados por fibras esclerenquimáticas (Sc). Barras: d – m: 50µm.



Fonte: Autor

Apesar de ser citada como espécie com folha coriácea (CRESPAM, 2010), verificou-se que a consistência das folhas também é semelhante a consistência cartácea (folhas finas, rígidas e quebradiças), pois apresentam-se de forma quebradiças quando desenvolvidas. Biologicamente, essas folhas são chamadas de esclerófilas e, descrevem lâminas foliares duras, resistente, rígidas ou coriácea (READ & SANSON, 2003). Esse tipo de folhas ocorre em vegetação que cresce sobre solos com baixo teor de nutrientes e em vários climas, incluindo o tropical úmido (SOBRADO & MEDINA, 1980; LAMONT et al., 2002). Os locais descritos por Ribeiro et al. (2010), na Serra do Espinhaço em Minas Gerais, assemelham-se com o local onde a *Aloysia hatschbachii* ocorre de forma natural citado por Siedo (2006) e Segecin (1995). Ambos os locais apresentam altitude, solo rochoso e endemia de espécies, ou seja, a associação entre tais características podem ter apresentado favorecimento de

características como a de esclerofilia em folhas. A esclerofilia da lâmina foliar, também confirmada por CNCFlora (2012), associada a câmara subestomática proeminente (Figura 2k), tem a função de aumentar a capacidade de armazenar CO₂, características estas de plantas que necessitam otimizar a captação de CO₂ ou conservá-lo, como observado por Lisboa et al. (2019), que verificou aumento na concentração de CO₂ na câmara subestomática. O fato de a câmara subestomática ser maior que o poro estomático, está associado a admissão de dióxido de carbono, ou seja, está relacionado diretamente com maximização de absorção de CO₂ do que pela necessidade de minimizar a perda de água (PICKARD, 1981).

Pela microscopia de varredura (MAV) e diafanização (Figura 2d-g) do limbo foliar é possível visualizar a cobertura da epiderme. Os estômatos da *A. hatschbachii* estão presentes apenas na face abaxial do limbo foliar, caracterizando a espécie como hipoestomática e são do tipo anomocítico/ranunculáceo (Figura 2l), os quais são envoltos por variado número de células epidérmicas de tamanho e formato semelhantes as demais células epidérmicas (ALQUINI et al., 2013). A característica hipoestomática e anomocítico (Figura 2k-l) foram também observadas por Segecin (1995), além de outras espécies do gênero, como *A. citriodora* (GATUSO et al., 2008; CALZADA-SÁNCHEZ et al., 2014). Na face abaxial (Figura 2e; 2g), há a presença de estômatos, e ocorre deposição de cera epicuticular e presença de densa pilosidade, formando emaranhado de cera e tricomas, e na face adaxial (Figura 2 d; 2f) é possível até mesmo observar células epidérmicas, devido a menor deposição de cera e tricomas em comparação à face abaxial. O índice de estômatos não apresentou diferença significativa, com valor média de densidade de 0,879 estômatos.

A epiderme possui densa cobertura por tricomas tectores e glandulares, espalhados por toda a lâmina foliar (Figura 2 d; e; f; g). A partir da densidade de tricomas tectores e glandulares (Tabela 1), foi possível observar maior densidade na face abaxial em comparação à face adaxial. Essa característica pode conferir proteção para a face onde os estômatos estão presentes. Algumas espécies, como do gênero *Verbena* apresentam maior densidade de tricomas tectores, na face abaxial (MORCELLE et al., 2012). Da mesma forma, Tozin et al. (2016), verificaram em alguns gêneros de Lamiaceae e Verbenaceae maior quantidade de tricomas tectores na face abaxial. Os tricomas, entre as várias funções, podem modular, por exemplo, a condutância foliar e absorção de energia (BICKFORD, 2016) e tanto a composição química, função e estrutura podem variar no mesmo órgão, como em folhas de *Quercus ilex*, na qual a face abaxial é hidrofóbica, devido a composição dos tricomas, diferente da face adaxial, que é hidrofílica.

Tabela 1 - Densidade média de tricomas glandulares e tectores da face foliar adaxial e abaxial de plantas de *Aloysia hatschbachii*, analisados em diferentes porções da planta.

Face da epiderme	Densidade de tricomas (mm ⁻²)
Abaxial	137,6 a
Adaxial	126,6 b
CV%	14,29

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem os terços pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Segundo Calzada-Sánchez et al. (2014), tricomas tectores e glandulares são estruturas reconhecidas como comuns em indivíduos da família Verbenaceae. Os tricomas tectores presentes na espécie são do tipo cônico, base grande e extremidade fina, com células volumosas dispostas radialmente na base e unicelular e/ou multicelular (Figura 2d; f; k). Os tricomas glandulares possuem na sua extremidade uma cabeça unicelular, com haste ou pedúnculo curto e multicelular (Figura 2d; i; k) e geralmente apresentam menor tamanho em comparação aos tricomas tectores. Entre as porções inferior, médio e ápice na face adaxial das folhas de *A. hatschbachii*, os tricomas estão presentes em maior densidade nas porções do ápice, não diferindo significativamente da porção inferior. A porção média, com a menor densidade de tricomas, não houve diferença significativa da porção inferior (Tabela 2). Folhas do ápice apresentaram maior densidade de tricomas provavelmente devido a maior exposição à radiação solar, sendo que a camada limítrofe desse órgão permanece em constante estresse. Em *Lippia citriodora* Lam., a diminuição da luminosidade favoreceu o decréscimo no número de tricomas (GOMES et al., 2009), assim como Rossato & Kolb (2010) constataram maior frequência de tricomas com maior luminosidade e disponibilidade hídrica em *Gochnatia polymorpha*, além também de relação do aumento da frequência estomática, com o aumento da densidade de tricomas. Ainda, os autores confirmam que a pubescência na epiderme abaxial confere resistência ao estresse, influenciando na camada limítrofe da folha, o que pode ser visualizado nas plantas de *A. hatschbachii*, que apresenta maior “pubescência” na face abaxial, a qual encontram-se os estômatos, conferindo elevação na resistência dos estômatos aos estresses. A face abaxial não houve diferença significativa entre os terços analisados.

Tabela 2 – Densidade média de tricomas glandulares e tectores por mm^{-2} da face foliar adaxial de plantas de *Aloysia hatschbachii*, analisados em diferentes porções da planta.

Porção da planta	Densidade de tricomas (mm^{-2})
Ápice	126,8 a
Médio	105,3 b
Inferior	124,7 ab
CV%	14,49

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem os terços pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A parede das células epidérmicas (em vista frontal) são curvas (Figura 2d; f), com camada cuticular bastante espessa recobrimo-a (Figura 2h; i), caracterizando elevada camada protetora. Essa camada (cutícula) é considerada mecanismo de resistência à perda de água pela planta, além de proteção sob alta irradiação solar e promover o equilíbrio na interação planta e ambiente como um todo (BERNARD & JOUBÈS, 2013). O estudo de Yang et al. (2011) com *Arabidopsis*, constatou que indivíduos com maior acúmulo de cera, aumentam as chances de sobrevivências, mas não bastando somente a característica do acúmulo de cera, assim como a composição desta (FIGUEIREDO et al., 2012).

A epiderme adaxial de *A. hatschbachii* apresentou um múltipla camada de células, apresentando geralmente duas camadas de células (Figura 2i). Para Segeccin (1995), trata-se de epiderme bisseriada, característica desta espécie. Porém, a diferenciação entre hipoderme e epiderme múltipla é de difícil conclusão, pois a hipoderme tem origem do meristema fundamental (MARTINS et al., 2012). Os cristólitos (Figura 2j), visualizados também a partir da diafanização da folha (Figura 2 f), presentes apenas na face adaxial da lâmina, também foi visualizado por Segeccin (1995) apenas nesta face das folhas. Estes cristólitos podem conter substâncias como carbonato de cálcio, o qual é encontrado em *A. citriodora* (GATTUSO et al., 2008), influenciando na ingestão do material vegetal por animais, pois os cristólitos conferem maior resistência mecânica à ingestão e digestão do vegetal (SILVA et al., 2012).

Tanto a hipoderme como a epiderme múltipla são tecidos de revestimentos (MAUSETH, 2006; ALQUINI et al., 2013) e essa camada mais espessa ou multisseriada da epiderme apresenta como principal função a de proteção, evitando a maior exposição do parênquima paliçádico ao excesso de radiação UVB, prevenção de murchamento em caso de alta intensidade luminosa e aumenta a reflectância (CHAZDON & KAUFMANN, 1993; STRAUSS-DEBENEDETTI & BERLYN, 1994; MARQUES et al., 2000). Na descrição anatômica foliar de arbustos e árvores medicinais na Argentina, realizado por Arambarri et al. (2008), constataram uma predominância de espécies de características mesomórficas, como

por exemplo hipoestomáticas, mesofilo dorsiventral e também características xeromórficas como a cutícula espessa, epiderme formada por células grandes ou por multicamadas, características estas também presentes na *A. hatschbachii*.

O clima descrito da região, sob variação pluviométrica, além do solo tipo rochoso e pobre em nutriente, além da elevação em relação ao nível do mar do local descrito onde a *Aloysia hatschbachii* apresenta-se de forma endêmica, sugere que estas condições favoreceram as características de endemia e camada de proteção proeminente da folha, como a cutina e epiderme espessas, elevada pilosidade, além da esclerofilia presente, folha hipoestomática e cavidade subestomática proeminente. Esta característica de endemia é encontrada em outras espécies do gênero, como a *Aloysia cordata*, também endêmica no estado do Paraná, e comumente localizada entre as cidades de Curitiba e Paranaguá, em ambientes alagados, baixa altitude e ribeirinhos (SIEDO, 2012).

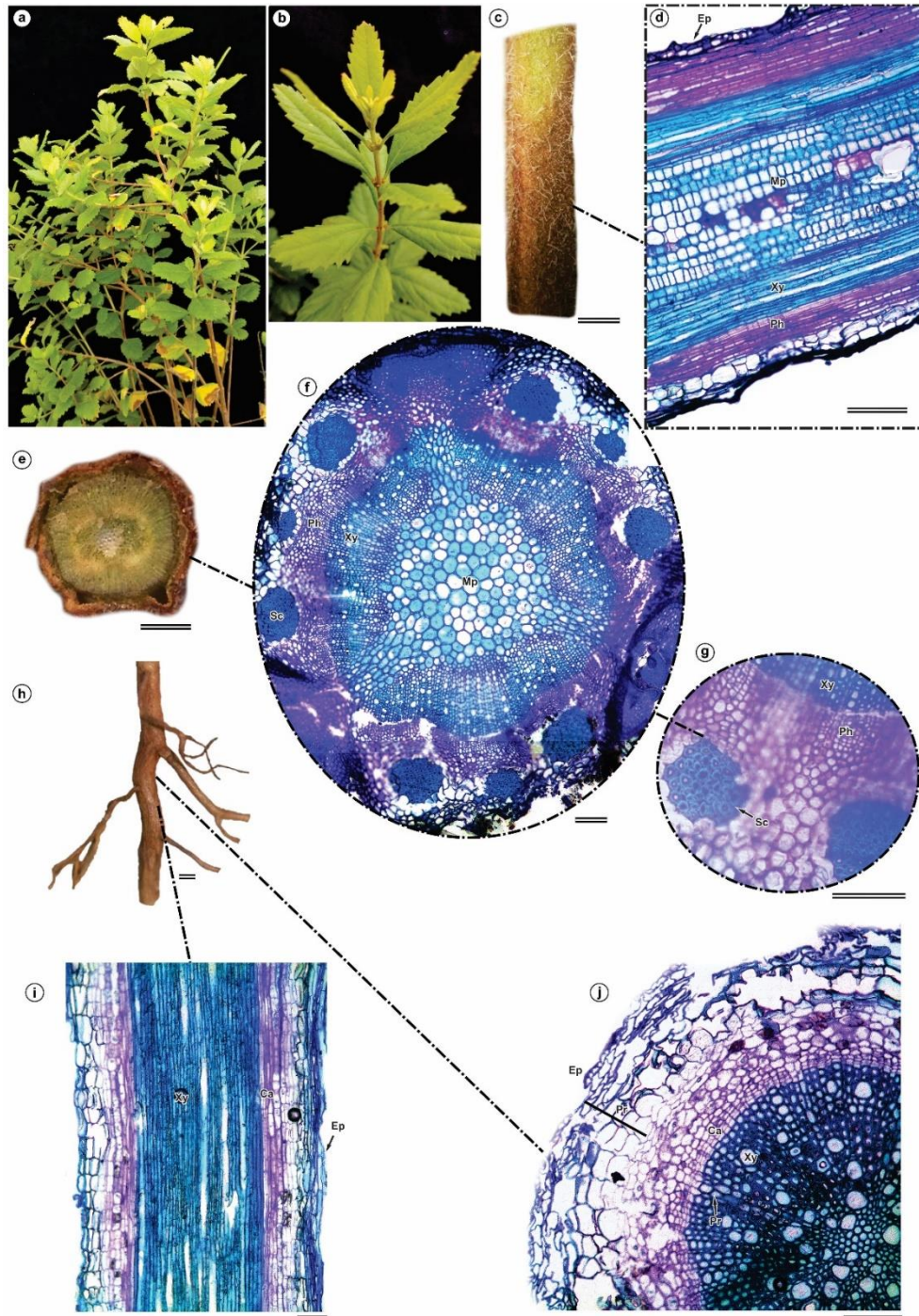
O mesofilo foliar do tipo dorsiventral, apresentou em geral, dois estratos de parênquima paliádico, em momentos com até três estratos de células, voltada para a face adaxial e cloroplastos presentes na periferia das células (Figura 2i). A camada de parênquima lacunoso voltadas para a face abaxial apresentou também a presença de cloroplastos (Figura 2k), porém, em menor quantidade. Esse padrão anatômico de mesofilo dorsiventral/bifacial é uma característica geral dos membros da família Verbanaceae (CALZADA-SÁNCHEZ et al., 2014), tendo em vista que se trata de característica padrão das dicotiledôneas. A nervura central é plano convexa (Figura 2h), com fibras esclerenquimáticas envolvendo o feixe vascular, formando uma bainha em forma de vértice (Figura 2h; m) e sob a epiderme, nesta região, tanto na face abaxial como adaxial, ocorrem entre duas a três camadas de colênquima (Figura 2h).

3.5.3 Morfoanatomia de ramos

Os indivíduos avaliados no presente trabalho apresentaram altura de 1,00 m, bem como o hábito arbustivo, ramificação densa do tipo monopodial (Figura 3a). A morfologia da haste de *A. hatschbachii* possui formato tereto (cilíndrico/roliço) ou quadrangular em secção transversal (Figura 3e-f) e superfície estrigosa (Figura 3c), pode-se observar que hastes/ramos apresentaram densa pilosidade, principalmente em tecidos jovens, além disso, a coloração apresentou variações na tonalidade de acordo com a idade do tecido, com coloração verde em tecidos jovens, a marrom e marrom-avermelhado em tecidos lignificados (Figura 3c). Esta descrição morfológica confere com as características atribuídas à espécie por Moldenke

(1969), que descreveu a *A. hatschbachii* como arbusto, com aproximadamente 1,5 m de altura, ramos e galhos delgados, marrons e entrenó muito próximos, tecidos jovens com densa pilosidade, diminuindo conforme aumenta o grau de lignificação do tecido. Siedo (2006) a descreveu como uma planta arbustiva com cerca de 1-2 metros de altura. Ramos pilosos são comumente encontrados em indivíduos da família Verbenaceae, assim como em ramos de *Stachytarpheta cayennensis* que são densamente pilosos (CARDOSO et al., 2018).

Figura 3 - Morfoanatomia do caule e raiz de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Morfologia de *Aloysia hatschbachii*, arbusto com cerca de 0,90 m de altura, demonstrando hastes de cor marrom-avermelhada, com diversas ramificações. **(b)** Ápice de haste com coloração verde intensa (tecidos jovens) e emissão de gemas laterais próximo ao nó. **(c)** Secção de haste pubescente (densa cobertura pilosa), transição de coloração marrom-avermelhada para coloração verde em hastes em desenvolvimento (estruturas jovens). **(d)** Corte longitudinal de haste evidenciando a anatomia interne, destacando a periderme (Ep), parênquima medular (Mp) ao centro e vasos condutores na sequência, xilema (Xy) e floema (Ph). **(e)** Corte transversal de secção de haste evidenciando o estado do órgão, com parte do súber da periderme destacando-se da parte interna do caule. **(f)** Corte transversal da haste evidenciando a anatomia do órgão, com parênquima medular (Mp) central, xilema (Xy) e floema (Ph) e fibras esclerenquimáticas (Sc) formando feixes distribuídos em toda a circunferência do caule. **(g)** Detalhe do corte transversal do caule, evidenciando a presença das fibras esclerenquimáticas (Sc) com parede secundária bem espessa, xilema (Xy) e floema (Ph). **(h)** Secção de raiz principal e ramificações de raízes laterais. **(i)** Corte longitudinal da raiz evidenciando o xilema (Xy), cambio vascular (Ca) e a epiderme (Ep), tecido localizado na extremidade do corte. **(j)** Corte transversal do caule evidenciando o xilema (Xy) ao centro, com raios parenquimáticos (Rp) projetados do centro em direção ao câmbio vascular, floema (Pf) externamente ao câmbio vascular e periderme (Pr) externamente ao corte. Barras: d, f, g, i, j: 50µm; c, e, h: 500 µm.



Fonte: Autor

Na caracterização histológica do caule se verificou que a região central, vista em corte transversal, é preenchida por células parenquimáticas volumosas designado de medular, com paredes delgadas (Figura 3d-e), apresentando algumas células colapsadas (Figura 3d) ou quando na falta destas células parenquimáticas, apresenta-se completamente oca. Em muitos casos, o parênquima medular, juntamente com o córtex apresentam a função de reserva em

plantas aromáticas, como por exemplo a *Hymenaea martiana* (SILVA et al., 2012) e *Costus spicatus* (PAES et al., 2013) na forma de grânulos de amido, os quais podem ser visualizados na figura 3 f, pequenos pontos avermelhado ao centro das células medular. O sistema vascular contínuo, ou seja, estrutura sifonostélica, com secção de células de xilema (Xy) apresenta muitas vezes o dobro da espessura de secções de células de floema (Ph), além de apresentar lacunas, podendo ser diferenciadas pelo fato de células xilemáticas apresentarem parede secundária lignificada, reagindo assim com o azul de toluidina, corando-as em azul esverdeado (Figura 3f) e localizado periféricamente ao caule e o floema com células de menor tamanho, com coloração lilás. A Figura 3d auxilia na identificação da diferença entre xilema e floema em corte longitudinal, demonstrando que células xilemáticas apresentam maior espessura em relação as células floemáticas, além do tipo de deposição da parede secundária nos elementos traqueais xilemáticos na forma helicoidal.

Distribuídas em toda a circunferência da haste, próximo à periferia, as fibras apresentam espessamento da parede bastante acentuado, formando feixes de fibras (Figura 3 g) distribuídos por toda a haste (Figura 3f). As fibras são importante grupo de células em espécies sujeitas à movimentação do caule/haste, concedendo flexibilidade ao órgão (SANTOS et al., 2013) e importante tecido de sustentação de algumas espécies (SILVA et al., 2012). As células epidérmicas da haste são unisseriadas, de formato tabular (Figura 3d) e em alguns casos apresenta espaços entre a periderme e o interior do caule (Figura 3e), semelhante a um desprendimento.

3.5.4 Morfoanatomia de raiz

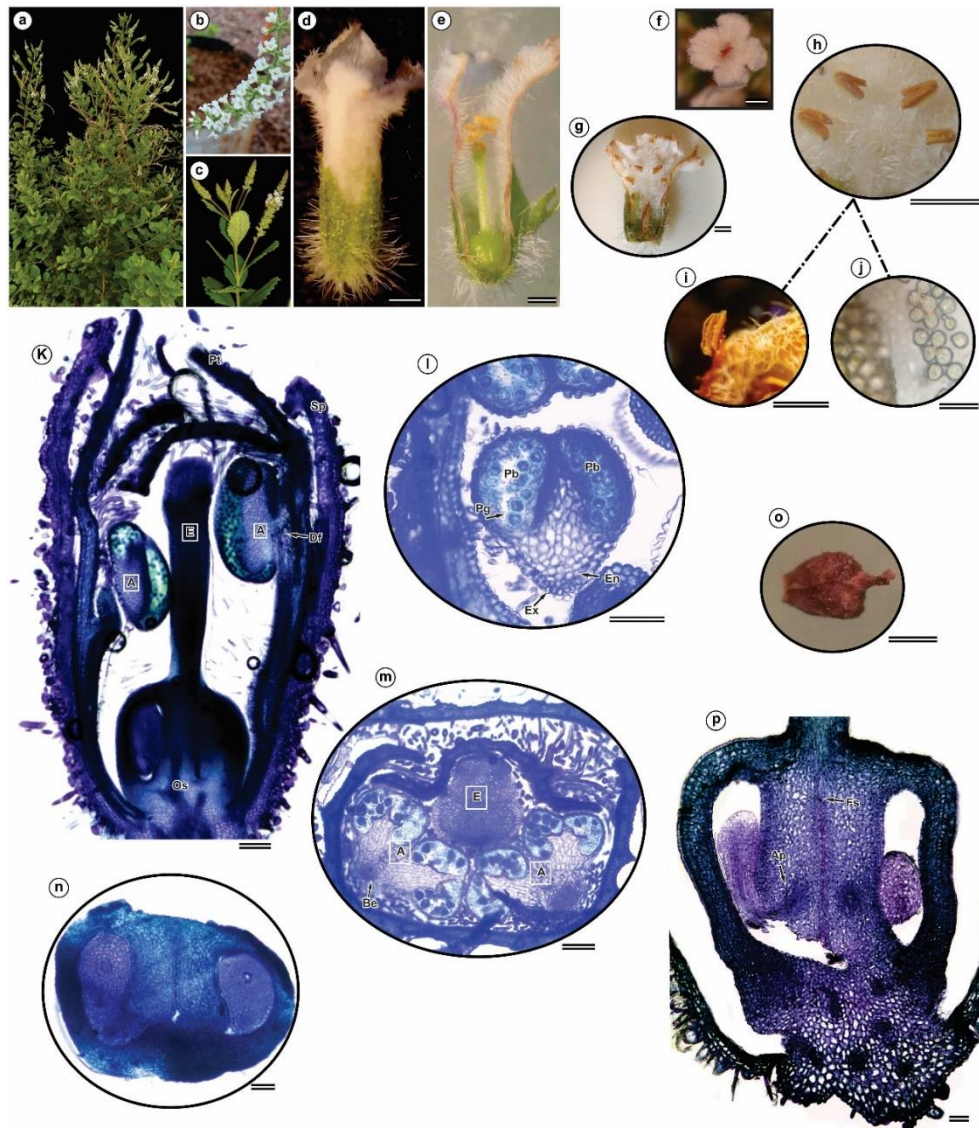
O sistema radicular ramificado, de origem normal, desenvolve ramificações a partir de raízes primárias, formando raízes secundárias, terciárias e assim sucessivamente (Figura 3h). Em corte transversal do sistema radicular (Figura 3f) é possível identificar a periderme da raiz (Pr), contemplando a epiderme unisseriada (externamente) e o felogênio (sentido externo interno do corte). Assim como no caule, as células floemáticas de coloração avermelhado-roxo, em direção a periferia da raiz, com células xilemáticas de coloração azul-esverdeada, na presença de raios parenquimáticos próximas ao xilema e sistema vascular poliarca. O câmbio vascular, com cerca de dois a três extratos de células apresentam-se de forma organizada, com células de menor tamanho, quando comparadas as células de xilema e floema.

3.5.5 Morfoanatomia de flor e fruto

A descrição morfológica de órgão floral é importante para caracterizar a espécie, além de diferenciá-las de outras espécies com certa semelhança, como é o caso do gênero *Aloysia*, no qual a *A. veluntina* é morfofologicamente semelhante à *A. scorodonioides*, distinguindo-as pela estrutura da inflorescência, além da morfologia dos frutos e pubescência (SIEDO, 2012). As inflorescências da *A. hatschbachii* são do tipo axilares e distribuem-se mais comumente na porção superior da planta (Figura 4a; b; c). A inflorescência da *A. hatschbachii* é do tipo racemo (Figura 4b; c), com um pequeno pedicelo de 0,5 mm inserido no eixo primário da flor (raquis), com cerca de três, quatro ou até cinco flores agrupadas, com perianto do tipo tubulosa. Siedo (2006) descreve a inflorescência com pedúnculo de 1,5-3,0 cm, ráquis com 3,0-9,5 cm de comprimento. Sob cada flor, uma bráctea lanceolada inferior, muitas vezes confundida com o cálice por ser muito semelhante na cor, iguala-se em comprimento com este, além de ser coberto por tricomas.

Figura 4 - Morfoanatomia da inflorescência de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **(a)** Inflorescência distribuída por toda a planta. **(b)** Detalhe morfológico aproximado de inflorescência do tipo racemo (pedunculada e pedicelada), com flor cíclica. **(c)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a forma de abertura das flores do tipo indefinida, composta, axilares e terminais. **(d)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a flor diclamídea, heteroclamídea; cálice de cor verde, gamossépalo e tetrâmero; corola de cor branca, gamopétala, tetrâmera e actinomorfa. **(e)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a flor do tipo hermafrodita, isostêmone, hipógina. **(f)** Detalhe morfológico aproximado da simetria floral do tipo actinomorfa. **(g; h)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando o androceu dialistêmone, filete de ramificação simples, anteras livres entre si, didínamo e estames epipétalos; deiscência introrsa. **(i)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando a antera diteca, deiscência da antera (abertura) longitudinal e (posição) introrsa. **(j)** Detalhe morfológico aproximado demonstrando o grão de pólen, de forma ovóide, agrupados ou isolado. **(k)** Corte longitudinal anatômico de flor, evidenciando o ovário súpero (Os), gineceu gamocarpelar, bicarpelar, estilete (E) terminal, estigma indiviso, bilocular e placentação axial; Anteras (A), pétalas (Pt) e sépalas (Sp) de flor; inserção do filete na antera do tipo dorsifixa (Df). **(l)** Corte transversal anatômico da antera, detalhando o saco polínico (Pb), exotécio (Ex) e endotécio (En) da antera e grão de pólen (Pg) no interior do saco polínico. **(m)** Corte

transversal anatômico da flor evidenciando o estilete (E), duas anteras adultas (A) e feixe líbero-lenho (Be) da antera. **(n)** Corte transversal anatômico evidenciando o ovário bilocular. **(o)** Detalha morfológico aproximado do fruto seco do tipo esquizocarpo. **(p)** Corte longitudinal anatômico do ovário evidenciando o tipo de placentação axial (Ap) ligado ao falso septo (Fs). Barras: d, e, f, g, h, i, o: 500 μ m; j, k, l, m, n, p: 50 μ m.



Fonte: Autor

O cálice com cerca de 2,2 a 2,6 mm (MOLDENKE, 1969) em forma de indumento (assim como a bráctea), apresenta cerca de 1,5 mm de comprimento e coloração verde, com quatro peças (tetrâmero) e gamossépalo (Figura 4 d). A corola lilás-esbranquiçada, tubulosa (3 a 3,5 mm) que se iguala ao cálice (em pré-floração), apresentou quatro peças (tetrâmera) e gamopétala, além de também apresentar a característica de indumento nas pétalas (Figura 4 d;

f); com 3,7 a 4,7 mm (MOLDENKE, 1969). Esta densa pilosidade presente em tecidos da planta (folhas, ramos/caule e flor), além de ser uma característica de algumas espécies da família Verbenaceae (CARDOSO et al., 2018), pode favorecer proteção dos tecidos, como constatado por Mussury et al. (2012), no qual foi evidenciado em plantas infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*, com visual proliferação de tricomas e produção de compostos fenólicos, como sendo uma característica de defesa destas plantas.

As inflorescências do tipo racemosa ou espiga são comuns no gênero *Aloysia*, além de brácteas discretas e cálice com quatro peças (MARX et al., 2010). Os verticilos de proteção, como as brácteas, são frequentes nas inflorescências (ENDRESS, 2010). A *A. hatschbachii* é semelhante a *A. lycioides*, sendo esta última também semelhante a *A. gratissima*, mas que além de conjunto cromossômico distinto, apresenta características morfológicas que permitam diferenciá-las facilmente (SIEDO, 2006). Como pode ser visualizado no trabalho de Thomas (2015), a inflorescência da *A. lycioides* é semelhante à inflorescência de *A. hatschbachii* (Figura 4 b). A partir de caracteres da inflorescência, flor, cálice e folhas, acredita-se que a *A. hatschbachii* também esteja relacionado com as espécies *A. cordata*, *A. brasiliensis*, *A. polygalifolia* e *A. chamaedryfolia*, sendo as três últimas espécies citadas relacionadas no trabalho de Thomas (2015), que a partir de ilustrações é possível observar as características de inflorescência e flor bastante semelhantes, demonstrando a importância da descrição floral para diferenciar a *A. hatschbachii* de espécies semelhantes.

Os estames inseridos no primeiro $\frac{1}{4}$ superior do tubo floral, são do tipo epipétalos e didínamos, com anteras introrsas (Figura 4 e; g; h), assim facilitando a transferência do pólen para o estigma. O ovário é supero e bicarpelar, apresentando falso septo (Figura 4 p) onde o ovário liga-se, formando um fruto do tipo esquizocarpo. Segundo Marx et al. (2010), o óvulo liga-se diretamente às margens do falso septo do carpelo em Verbenaceae. Esta característica de ligação do ovário (Figura 4g), ao qual liga-se com o falso septo do carpelo é uma característica importante para diferenciar as espécies da família Verbenaceae das Lamiaceae, formando fruto seco, monospermico, indeiscente do tipo esquizocarpo (Figura 4o).

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo possibilitam a compreensão das características morfológicas e anatômicas de *Aloysia hatschbachii*, no qual são indivíduos com folhas aromáticas, com consistência cartácea, esclerófila, hipostomática e densa cobertura de cera

epicuticular. A epiderme superior possui camada dupla de células câmara subestomática desenvolvida.

A espécie apresentou densa cobertura de tricomas tectores e glandulares, evidenciando o potencial de produção de óleo essencial. A densa cobertura de tricomas, não se restringe apenas as folhas, mas também está presente em pétalas, sépalas, brácteas e ramos, indicando a possibilidade de extração nestes órgãos da planta, além das folhas.

A presença de feixes de fibra envolto aos ramos auxiliam na sustentação, evidenciando o porte arbustivas e ereto da espécie. Além disso, as flores de *Aloysia hatschbachii* apresentam ovário supero, com presença de falso septo, o qual diferencia as Verbenaceae das Lamiaceae, com fruto do tipo esquizocarpo.

Portanto, através da caracterização morfoanatomica é possível afirmar que a espécie *Aloysia hatschbachii* apresenta características de acordo com o gênero botânico, confirmando a hipótese deste estudo. As informações obtidas neste estudo contribuem para a correta identificação da espécie *Aloysia hatschbachii* a campo, bem como seu uso para futuras pesquisas e possível cultivo no estado do Rio Grande do Sul. A partir das características de proteção constatadas nas folhas, a espécie demonstrou a possibilidade de sobrevivência em condições adversas.

3.7 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

3.8 REFERÊNCIAS

ALQUINI, Y., et al. Epiderme. In: B. Appezzato-da-Glória, S. M. Carmello-Guerreiro. **Anatomia Vegetal**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2013. p.403.

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

ARAMBARRI, A. M., et al. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones forest of the Paranaense Province (Argentina). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 43, n. 1-2, p. 31-60, 2008.

BERNARD, A.; JOUBÈS, J. Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 1, p. 110-129, 2013.

- BICKFORD, C. P. Ecophysiology of leaf trichomes. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 9, p. 807-814, 2016.
- BOTTA, S. M. Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 22, n. 1/3, p. 67-108, 1979.
- CALZADA-SÁNCHEZ, E.V., et al. Anatomía de hoja y tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México. **Botanical Sciences**, v. 92, n. 4, p. 469-480, 2014.
- CAMPOS, M. L., et al. Brassinosteroids Interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4347-4361, 2009.
- CARDOSO, P. H.; O'LEARY, N.; SALIMENA, F. R. G. Flora das cangas da Serra do Carajás, Pará, Brasil: Verbenaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1397-1403, 2018.
- CARMELLO-GUERREIRO, S. M. 1995. **Técnica de inclusão de material vegetal em historresina**. Botucatu: Departamento de Botânica da UNESP. 1995. p.8.
- CELEP, F., et al. Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Slavia quezelli* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 9, p. 1945-1958, 2014.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, v. 7, n. 4, p. 385-394, 1993.
- CNCFLORA. *Aloysia hatschbachii* In: Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em:<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Aloysia_hatschbachii>. Acesso em: 16 out. 2019.
- CRESPAM, P. C. **Estudos na família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 115 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.
- EMBRABA FLORESTA. **Mapa simplificado de Solos do Estado do Paraná**. 2012. Disponível em:<<http://www.sbcs-nepar.org.br/images/nepar/publicacoes/mapa-solo-pr.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2020.
- ENDRESS, P. K. Disentangling confusions in inflorescence morphology: patterns and diversity of reproductive shoot ramification in angiosperms. **Journal of Systematics Evolution**, v. 48, n. 4, p. 225-239, 2010.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FERNÁNDEZ, V., et al. Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: Effect of leaf side and age. **Plant Physiology**, v. 166, p. 168-180, 2014.

FIGUEIREDO, K. V., et al. Epicuticular-wax removal influences gas exchange and water relations in the leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid region under induced drought stress. **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 8, p. 685-692, 2012.

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**, v. 7, n. 4, p. 190-198, 2008.

GOMES, P. A., et al. Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lipia citriodora* Lam.). **Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 9-14, 2009.

GOOGLE EARTH-MAPAS. Disponível em: <<http://mapas.google.com>>. Acesso em: 17 de nov. 2019,

INSTITUTO DE BOTÁNICA DARWINION: **Herbario Darwinion**. 1969. 18: 341.

Disponível

em: <<http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=hatschbachii&genero=Aloysia&espcod=179329>>. Acesso em: 4 mar. 2019.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 127-128, 1965.

KLING, G. J.; HAYDEN, L. H. **Leaf margins: Revolute. UI Plants: Botanical terminology**. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2005. Disponível em: <<http://woodyplantstutorial.nres.illinois.edu/margins/mar-revolute.html>>. Acesso em: 02 abr. 2019.

LAMONT, B. B.; GROOM, P. K.; COWLING, R. M. High leaf mass per area of related species assemblages may reflect low rainfall and carbon isotope discrimination rather than low phosphorus and nitrogen concentrations. **Functional Ecology**, v. 16, n. 3, p. 403-412, 2002.

LISBOA, L. A. M., et al. Different light radiation intensities on Cotton: A physiological approach. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 35, n. 6, p. 1-8, 2019.

LU-IRVING, P., et al. Resolving the genera *Aloysia* and *Acantholippia* within tribe Lantaneae (Verbenaceae), using chloroplast and nuclear sequences. **Systematic Botany**, v. 39, n. 2, p. 644-655, 2014.

MARQUES, A. R., et al. Variations in leaf characteristics of two species of *Miconia* in the Brazilian cerrado under different light intensities. **Tropical Ecology**, v. 41, n. 1, p. 47-60, 2000.

MARTINS, S., et al. Do leaves in Cyperoideae (Cyperaceae) have a multiple epidermis or a hypodermis? **Flora**, v. 207, n. 5, p. 341-345, 2012.

MARX, H. E., et al. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **Annals of Journal Botany**, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010.

MAUSETH, J. D. Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. **Annals of Botany**, v. 98, n. 5, p. 901-926, 2006.

MOLDENKE, H. N. 1969. Seven more novelties in the Eriocaulaceae and Verbenaceae. **Phytologia**. v. 18, n. 6, p. 341, 1969.

MORCELLE, M. R.; GATTUSO, M. A.; APÓSTOLO, N. M. Stem and leaf anatomy of six species of *Verbena* native to Buenos Aires province, Argentina. **New Zealand Journal of Botany**, v. 50, n. 1, p. 3-14, 2012.

MORONI, P.; O’LEARY, N. *Aloysia* in: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15127>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

MÚLGURA, M. E. Verbenaceae. In: **Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina**. II. 1-34, 2007. Disponível em: <<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=hatschbachii&genero=Aloysia&espcod=179329>>. Acesso em: 9 out. 2019.

MÚLGURA, M. E.; ROTMAN, A. D.; ATKINS, S. **Verbenaceae. Flora Fanerogámica Argentina**, 253 p. Proflora, Argentina. 2003.

MUSSURY, R. M., et al. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2012.

O’LEARY, N., et al. Taxonomic revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 101, n. 3, p. 568-609, 2016.

PAES, L. S.; MENDONÇA, M. S.; CASAS, L. L. Aspectos estruturais e fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 38-390, 2013.

PICKARD, W. F. How does the shape of the substomatal chamber affect transpirational water loss? **Mathematical Biosciences**, v. 56, n. 1-2, p. 111-127, 1981.

READ, J.; SANSON, G. D. Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. **New Phytologist**, v. 160, n. 1, p. 81-99, 2003.

RIBEIRO, S. P.; CORRÊA, T. L.; SOUSA, H. C. Microscopic variability in mechanical defence and herbivory response in microphyllous leaves of tropical herb species from Serra do Cipó, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 2, p. 237-246, 2010.

RICCIARDI, G., et al. Examen del aceite esencial de “niño rupá” (*Aloysia gratísima*) Tronc. del Nordeste Comunicaciones. **Científicas y Tecnológicas**, v. 8, p. 93-97, 2000.

- 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 Experimental y Salud Pública**, v. 29, n. 1, p. 61-68, 2012.
- ROMERO, M. E. M., et al. Morfología de las inflorescencias en Verbenaceae, Verbenoideae iii: * tribu Lantaneae pp. **Darwiniana**, v. 40, p. 1-4, 2002.
- ROSSATO, D. R.; KOLB, R. M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and adaphic conditions. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 605-612, 2010.
- SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. 2015. *Aloysia* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15127>>. Acesso: 14 mar. 2019.
- SANTOS, S. R.; MARCHIORI, J. N. C.; SIEGLOCH, A. M. Estudos anatômicos do lenho de duas espécies de *Senegalia* RAF. (Fabaceae) com variabilidade de hábito. **Balduinia**, v. 42, p. 17-26, 2013.
- SEGECIN, S. Morfoanatomia das folhas cotiledonares, protofilo e metafilo de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **Akrópolis-Revista de Ciências Humanas da UNIPAR**, v. 3, p. 11, 1995.
- SIEDO, S. J. Four New Species of the Genus *Aloysia* (Verbenaceae). **Lundellia**, v. 15, p. 35-47, 2012.
- SIEDO, S. J. **Systematics of Aloysia (Verbenaceae)**. 2006. 209 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) University of Texas, Austin, 2006.
- SILVA, B. M. S.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* RA Howard.- FABACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 195-201, 2008.
- SILVA, N. S., et al. Fatores antinutricionais em plantas forrageiras. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 4, p. 01-07, 2012.
- SILVA, B. M., et al. Morfo-anatomia do fruto, da semente e da plântula de *Ormosia paraensis* Ducke. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p. 192-198, 2016.
- SILVA, M. S.; LEITE, K. R. B.; SABA, M. D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayna (Fabaceae-Caesalpinioideae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.
- SOBRADO, M. A.; MEDINA, E. General morphology, anatomical structure, and nutrient content of sclerophyllous leaves of the 'Bana' vegetation of Amazonas. **Oecologia**, v. 45, n. 3, p. 341-345, 1980.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de Calagem e Adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**: Sociedade Brasileira de Ciência

do Solo – Nucleo Regional Sul. – [s. l.] : Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC. 2016.

STRAUSS-DEBENEDETTI, S.; BERLYN, G. P. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. **American Journal of Botany**, v. 81, n. 12, p. 1582-1591, 1994.

THOMAS, E. **Caracterização química, atividade citotóxica e genotóxica do óleo essencial de espécies de *Aloysia paláu* (Verbenaceae) do Rio Grande do Sul**. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

TOZIN, L. R. S.; SILVA, S. C. M.; RODRIGUES, T. M. Non-glandular trichomes in Lamiaceae and Verbenaceae species: morphological and histochemical features indicate more than physical protection. **New Zealand journal of botany**, v. 349, n. 6, p. 446-457, 2016.

WEYERS, J. D. B.; JOHANSEN, L. G. Accurate estimation of stomatal aperture from silicone-rubber impressions. **New Phytologist**, v. 101, n. 1, p. 109-115, 1985.

YANG, J., et al. Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in *Arabidopsis* by changes in development of stomata. **Plant Physiology Biochemical**, v. 49, n. 12, p. 1448-1455, 2011.

4 ARTIGO II - FENOLOGIA DE *Aloysia hatschbachii* SOB CULTIVO EM REGIÃO SUBTROPICAL

Submetido em língua estrangeira para o periódico: Ciência e Natura.

Situação: Em avaliação.

Phenology of *Aloysia hatschbachii* cultivated in a subtropical region

4.1 Abstract

Aloysia hatschbachii is an endangered species that occurs endemically in Paraná and has potential for essential oil production. Expanding research on threatened species could serve as a tool to ensure their conservation, management and reproduction. In this study, we sought to evaluate phenological phases (phenophases) for species *Aloysia hatschbachii* in the years 2018 and 2019 by conducting monthly checks of a plant population consisting of 5 individuals, identifying the phenological events of budding, mature leaves, flowering, fruiting, leaf senescence and leaf fall, using the percent index of intensity as well as the index of activity in the sampled individuals regarding the occurrence of such phenomena, and then correlating phenological data with meteorological variables. The phenological phases showed synchrony in activity throughout most of the assessed period, but were not always synchronous in intensity. Budding occurred between September and April, and mature leaves were present all year round. The patterns of leaf senescence and leaf fall revealed that the species has nondeciduous characteristics. These phenophases were influenced by relative air humidity. Flowering occurred between November and March, while fruiting lasted from December to May, with the reproductive stage being influenced by air temperature and by incident solar radiation. The specie *Aloysia hatschbachii* has the characteristic of a non-deciduous plant.

Keywords: Aromatic plant. Budding. Phenopases.

4.2 Resumo

A espécie *Aloysia hatschbachii*, com potencial de produção de óleo essencial, ocorre de forma endêmica no estado do Paraná. Pesquisas envolvendo espécies que se encontram em risco de extinção, servem de ferramenta para sua conservação, manejo e reprodução. Desta forma, buscou-se avaliar as fases fenológicas da espécie *Aloysia hatschbachii*, nos anos de 2018 e 2019, através da avaliação mensal da população de plantas (5 indivíduos), identificando as fases fenológicas (fenofases) de brotamento, folhas maduras, floração, frutificação, folhas senescentes e queda foliar, através do percentual de intensidade e índice de atividade fenológica dos indivíduos e correlacionando a fenologia com as variáveis meteorológicas. As fases fenológicas apresentaram sincronismo de atividade na maior parte do período avaliado, porém a intensidade em muitos casos foi baixa. O brotamento ocorre entre os meses de setembro a abril, além disso as folhas maduras estão presentes durante todo o ano. Pela senescência e a queda foliar se constatou que a espécie não apresenta característica decídua. Estas fenofases são influenciadas pela umidade relativa do ar. A floração ocorre entre os meses de novembro a março e a frutificação de dezembro a maio, sendo o período reprodutivo influenciado pela temperatura do ar e pela radiação solar incidente. A espécie *Aloysia hatschbachii* apresenta característica de planta não decídua.

Palavras-chave: Planta aromática. Fenofases. Brotamento.

4.3 Introduction

Increasing consumption of medicines made from medicinal plants and aromatic herbs is clearly evident, and in some countries the volume of sales has been boosted by about 500% in only 10 years (GODOY et al., 2013). As a result, manufacturers in this sector have evolved into a highly sophisticated and competitive industry while trying to follow the market trends. So, today, there is a need to prioritize research into the use and effects of such plants to ensure their correct use, by encouraging ethnobotanical and ethnopharmacological studies and by compiling information on the biodiversity of the existing local species (FIRMO et al., 2011).

Family Verbenaceae includes a large variety of aromatic plants and is considered cosmopolitan, spreading mainly across tropical and subtropical regions and comprising around 100 genera and 2,000 species of trees, shrubs and herbs (LIRA, 2016). Belonging in that family, genus *Aloysia* is distributed across the Americas, from United States to Patagonia, and includes around 30 species (BOTTA, 1979; RICCIARD et al., 2000; MÚLGURA et al., 2003; SIEDO, 2006). This genus includes mainly aromatic shrubs considered of great importance and used widely in both traditional and folk medicines (RICCO et al., 2010). The phytochemistry of this genus has detected presence of many monoterpenes and sesquiterpenes in its most commonly studied species (VANDRESEN et al., 2010; MORAIS et al., 2012; PROCHNOW et al., 2017; SGARBOSSA et al., 2019), which has been attracting growing interest for its potential for essential oil production.

Species *Aloysia hatschbachii* Moldenke, originally from Brazil (SIEDO, 2006; LU-IRVING, 2014), is known to be present in Paraná state, more precisely in the towns of Piên and Rio Negro, and is considered a spontaneous, endemic species of that region (SEGECIN, 1995; SIEDO, 2006; MÚLGURA, 2007). A new occurrence of the species has been cited in Rio Grande do Sul state, more precisely in Caracol Park, which is in the town of Canela (CRESPAM, 2010), and a possible occurrence has also been cited in northern Pará state (MORONI and O'LEARY, 20..). According to Brazil's National Flora Conservation Center - CNCFlora, *Aloysia hatschbachii* is categorized as an endangered species (EN), since the area of its natural occurrence is less than 5,000 km² and subjected to intense forest and agricultural activity (CNCFlora, 2012).

Native species from regions with seasonal climate usually show variations in their leaf, flower and fruit production, which determines their adaptations to biotic and abiotic factors (VAN SCHAİK et al., 1993). These adaptations relate to structural and functional characteristics, which in turn are analyzed by phenology. Keeping records of phenological data is critical because it serves as an indicator of plant responses to climate conditions while contributing information on the annual cycle of species, and these annual cycles are directly related to weather conditions and to the adaptive characteristics of each species (ANDREIS et al., 2005).

Phenological studies are crucially important in that they help understand the reproduction process (FISCH et al., 2000) and domestication, besides helping define cultivation techniques (PEREIRA et al., 2008). Also, they have proved useful for taxonomists and for departments engaged in reforestation projects (KUARAKSA et al., 2012). And, more recently, research on phenological events has drawn the attention of scientists following

confirmation of the existing connections of phenology with climate change, serving as an indicator of climate change due to the alterations it causes to the life cycle of plants (CHAMBERS et al., 2013; RICHARDSON et al., 2013; ANWAR et al., 2015).

Factors of climate that affect phenophases or at least have some type of relationship with phenological manifestation, include precipitation, temperature, relative humidity and photoperiod (ATHAYDE et al., 2009; PIRANI et al., 2009; AZEVEDO et al., 2014). In semi-arid regions, fruit development usually is closely related to rainfall (LIMA and RODAL, 2010), while in subtropical regions such as in southern Brazil, the reproductive period of plants is affected by temperature and by photoperiod (ATHAYDE et al., 2009). Some researchers, however, argue that phenological events are genetically determined, which means they are induced by life forms and are thus independent of abiotic factors (WRIGHT and CALDERON 1995).

Since data on phenological events are nonexistent for *Aloysia hatschbachii* and since researching them is of critical importance to understanding how the species functions and to verifying the occurrence of patterns in its annual cycle, the objective of this study is to evaluate the phenological events of aromatic species *Aloysia hatschbachii*, correlating them with meteorological variables, in an attempt to contribute toward the conservation and management of this endangered species.

4.4 Material and methods

4.4.1 Characteristics of the study site

The study was conducted in the experimental site of the Federal University of Santa Maria, Frederico Westphalen Campus, located at latitude 27° 23'26"S and longitude 53° 25'43"N, at an altitude of 461 m, in the municipality of Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul state.

According to the Köppen climate classification, the local climate is described as Cfa, which means well-defined seasons throughout the year and well-distributed rainfall, around 100 to 170 mm each month (ALVARES et al., 2013). Meteorological data for the assessed period are depicted in Figure 1, with variations found throughout the experiment as follows: the lowest monthly average air temperature was 13.8 °C in August 2018, against 25.1 °C in January 2019 as the highest; In relation to minimum temperatures, it was possible to record temperatures favorable to frost formation (0.5; -1.8; -0.5 °C between July 05 and 07, 2019) during the phenological evaluation, besides the extremes 35.6 °C in early February; the lowest monthly average relative air humidity was 66% in September 2019, against 87% in May 2019 as the highest; the lowest cumulative monthly precipitation was 32.40 mm in June 2019, against 327 mm in October 2018 as the highest; and the lowest monthly average global incident solar radiation was 11.95 MJ m² in May 2019, against 25.79 MJ m² in December 2018 as the highest. O presente estudo foi desenvolvido na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Frederico Westphalen, localizado na latitude 27° 23'26"S; longitude 53° 25'43"N e altitude de 461 m, no município de Frederico Westphalen – RS.

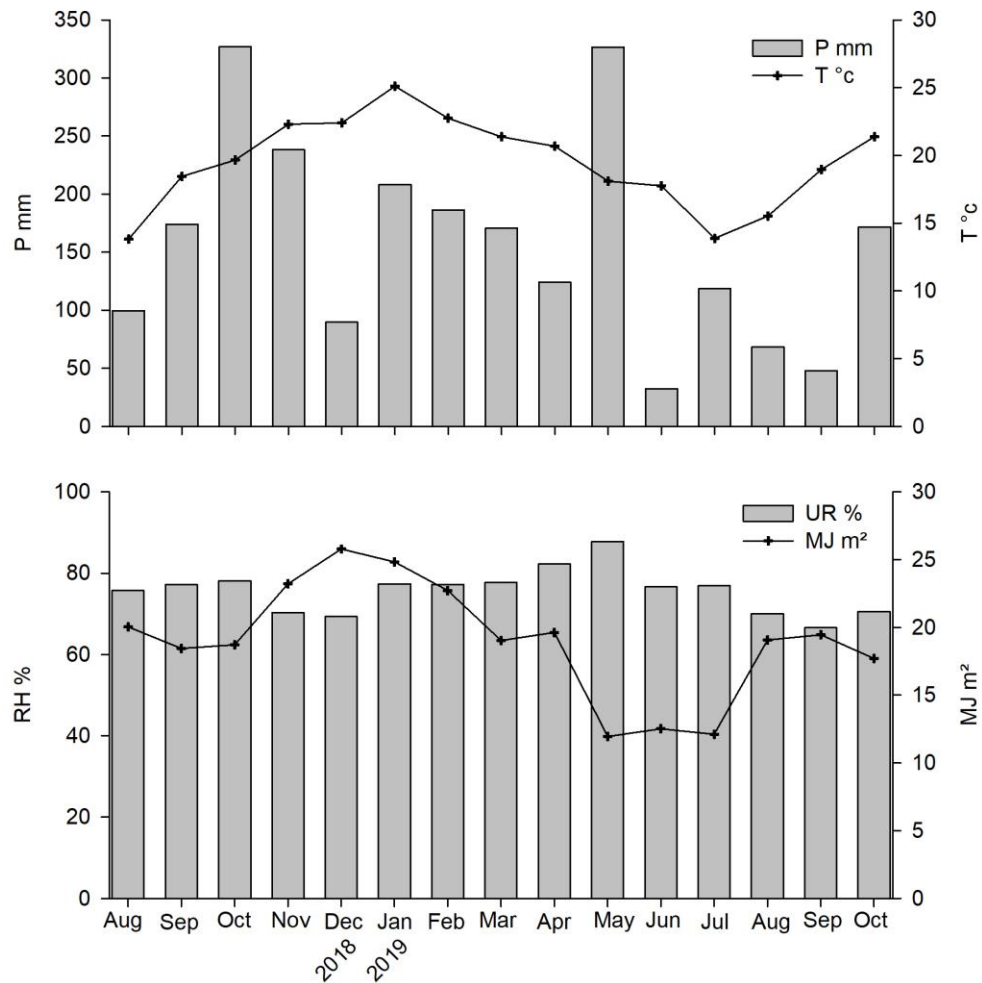


Figure 5 - Meteorological variables for the period of phenological assessments (August 2018 to October 2019) of species *Aloysia hatschbachii* (P mm = cumulative monthly precipitation) T °C = average monthly air temperature; RH % = average monthly relative humidity; MJ m² = average incident monthly global solar radiation).

4.4.2 Phenological observations

Observations were recorded of field-grown adult plants subjected to suitable phytosanitary conditions and manually irrigated using a watering can. The sample specimens were obtained from a parent plant which had been donated by the Botanical Garden of Curitiba, then propagated vegetatively using cuttings.

Tests were performed every fifteen days, on five plant specimens, from August 2018 to October 2019, to a total of 28 observations. According to Fournier & Charpentier (1975), that count of individuals and observations is considered sufficient for carrying out a study on plant phenology.

The characterization of the phenophases of *Aloysia hatschbachii* comprised assessments from the vegetative growth period through to the reproductive period, and include: (1) Budding: emergence of leaf buds

through to new fully expanded leaves; (2) Mature leaves: dark-green fully expanded leaves; (3) Leaf senescence: progressively yellowed leaves; (4) Flowering: emergence of flower blossoms through to the last fully open flowers (anthesis); (5) Fruiting: end of anthesis and subsequent confirmation of seed formation/presence; (6) Leaf fall: confirmation of fallen leaves, missing leaves on the branches, and leaves on the ground below the plant specimen. At this point, observations are recorded as to presence or absence of each phenophase (GOMES, 2017).

To quantify the intensity of each phenophase, we used the methodology proposed by Fournier (1974), known as Fournier's percent index of intensity. It quantitatively estimates stages such as budding, flowering, fruiting, leaf formation and leaf fall, using a simple method to assess distinct specimen characteristics at different dates, and accurately defining performance patterns to then produce phenological representations. This method is commonly used to provide phenological description of trees, understory shrubs and aromatic plant species (MORELLATO et al., 2000; BENKE e MORELLATO, 2002; MARTIN-GAJARDO e MORELLATO, 2003; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2007; LOPES e JARDIM, 2008; CARVALHO JÚNIOR et al., 2011; GOULART et al., 2013; MACHADO, 2013; GOMES, 2017).

The methodology proposed by Fournier (1974) consists of individual assessments using a scale of five categories with scores from 0 to 4, with a 25% interval between categories, where: 0 = absence of a phenological event; 1 = presence of a phenological event within an interval from 1 to 25%; 2 = presence of a phenological event within an interval from 26 to 50%; 3 = presence of a phenological event within an interval from 51 to 75%; 4 = presence of a phenological event within an interval from 76 to 100%. Each month, intensity scores for all individuals are brought together (\sum Fournier), divided by the possible maximum (number of individuals multiplied by four) (N), then multiplying the result by 100 to turn it into a percentage, as provided by the formula below (BENKE e MORELLATO, 2002; MARTIN-GAJARDO e MORELLATO, 2003).

$$\% \text{ de Fournier} = \frac{\sum \text{Fournier}}{4 \cdot N} \cdot 100 \quad (1)$$

To verify synchrony between individuals in each phenophase, we used the index of activity (percent of individuals), which simply consists of keeping records as to presence or absence of a phenological event in each individual and indicating the percent of individuals manifesting that event, by using the method described by Benke & Morellato (2002), assigning the following magnitudes to manifestation of a given phenological event: 20% or less = asynchrony; 20 to 60% = weak synchrony; 60% or more = synchrony.

The phenological data was tabulated and then merged with the meteorological data that had been collected by the institution's Agrometeorology Laboratory from an automatic weather station located in the

Frederico Westphalen Campus. The phenological and meteorological data were then subjected to Pearson correlation analysis using statistical software Genes (CRUZ, 2013).

4.5 Results

Results in Figure 2-A show that, in 2018, species *Aloysia hatschbachii* started the differentiation process of vegetative buds in August, a time when mild temperatures still predominate. Buds started to emerge in September, though with low intensity still. The peak intensity of this phenological event occurred in October (100%) and from then on there was a decline, though intensity remained above 20% until January. Through May, June and July the event was not observed. In the following year (2019), buds started to emerge a month earlier, in August, compared to 2018. Despite early, the budding event shows weak synchrony, as it was not manifested by all individuals. The index of activity (solid line) illustrates phenophase synchrony, that is, the count of individuals in the plant population manifesting a physiological event. The budding phase of *A. hatschbachii* showed synchrony (>60%) among individuals from September to December in 2018 and from September to October in 2019, but for the remainder of the assessed period it showed weak synchrony.

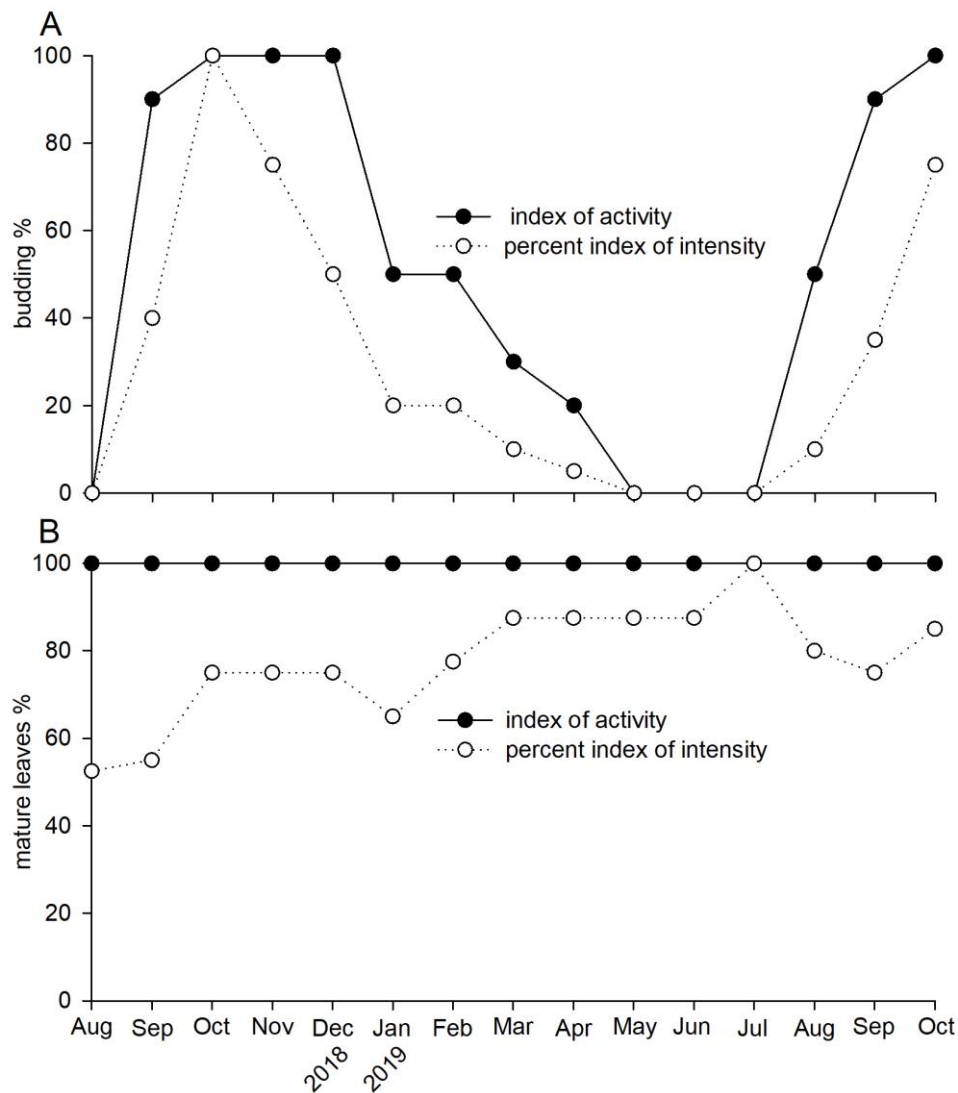


Figure 6 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for budding (a) and mature leaves (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.

Mature leaves (Figure 2-B) was the most noticeably present phase over the assessment period, showing a peak maximum index of activity that reveals synchrony, with presence of mature leaves for a large part of the year. The percent index of intensity for this phase was invariably above 50%, reaching a peak maximum in July (100%). Another concern among aromatic plants is the availability of material for the extraction of essential oils. The phenophase of mature leaves, it was possible to observe maximum activity index during the whole year, that is, activity index with synchronism and intensity percentages above 50%, making it promising in relation to the availability of vegetable material. Moreover, in July 2019, through the registration of minimum temperatures, there was a favorable period for the formation of frost, showing some tolerance of the species to the formation of frost in its plant canopy, due to the maintenance of mature leaves after the month of July.

The flowering phase (anthesis), depicted in Figure 3-A, started in November and had its last occurrence in April. The index of activity reveals weak synchrony in this phase (between 20 and 60%), although there was synchrony from December to March. The peak percent index of intensity was just above 60%, in January, that is,

despite the flowering phase being present in all individuals, the intensity of the event was not high. In 2019, the flowering phase was observed a month earlier, in October, and revealed asynchrony (20% or <).

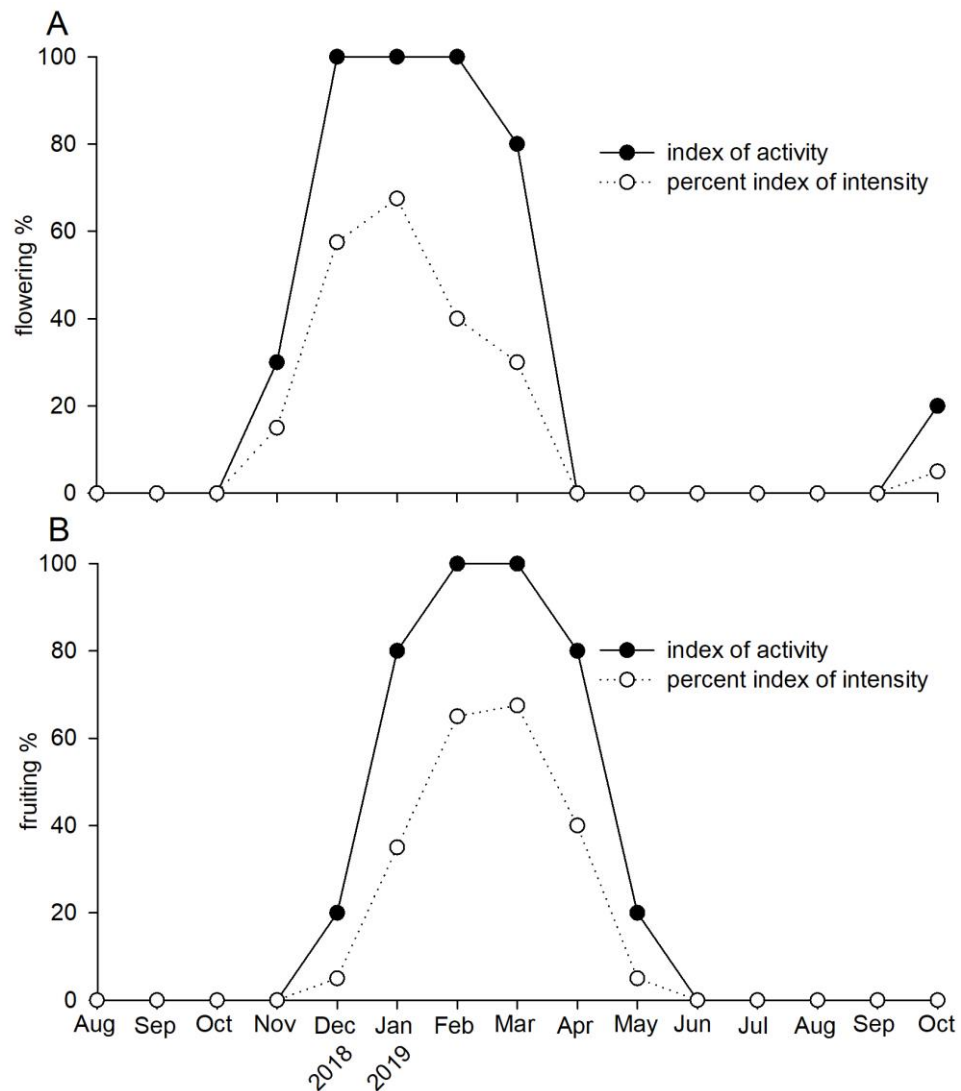


Figure 7 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for flowering (a) and fruiting (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.

The fruiting phase (Figure 3-B), regarded as the period when fruits ripen, started in December and lasted until May. During this phase, the index of activity reveals synchrony from January to April, and asynchrony in the remainder of the period. The percent index of intensity, similarly to the flowering phase, was not high, with a peak maximum of just above 60% in February and March, but dropping to below 40% in the remaining period, thus representing uneven ripening of fruits.

The senescence phase (Figure 4-A), similarly to leaf fall, is represented by yellowed leaves in the process of about to fall off. This phenophase was observed from January to September and proved the most synchronous phase, since throughout virtually the entire assessed period, the index of activity was 60% or over, except in September of 2018 and 2019, when it reveals weak synchrony. The percent index of intensity reached a peak

maximum between April, May and June (70 to 80%). After June, the intensity of this phenomenon declined due to increasing emergence of young leaves (budding). From observations, it can be said that the decline in intensity was only a prolonged senescence of older leaves, usually found at the base portion of the plant.

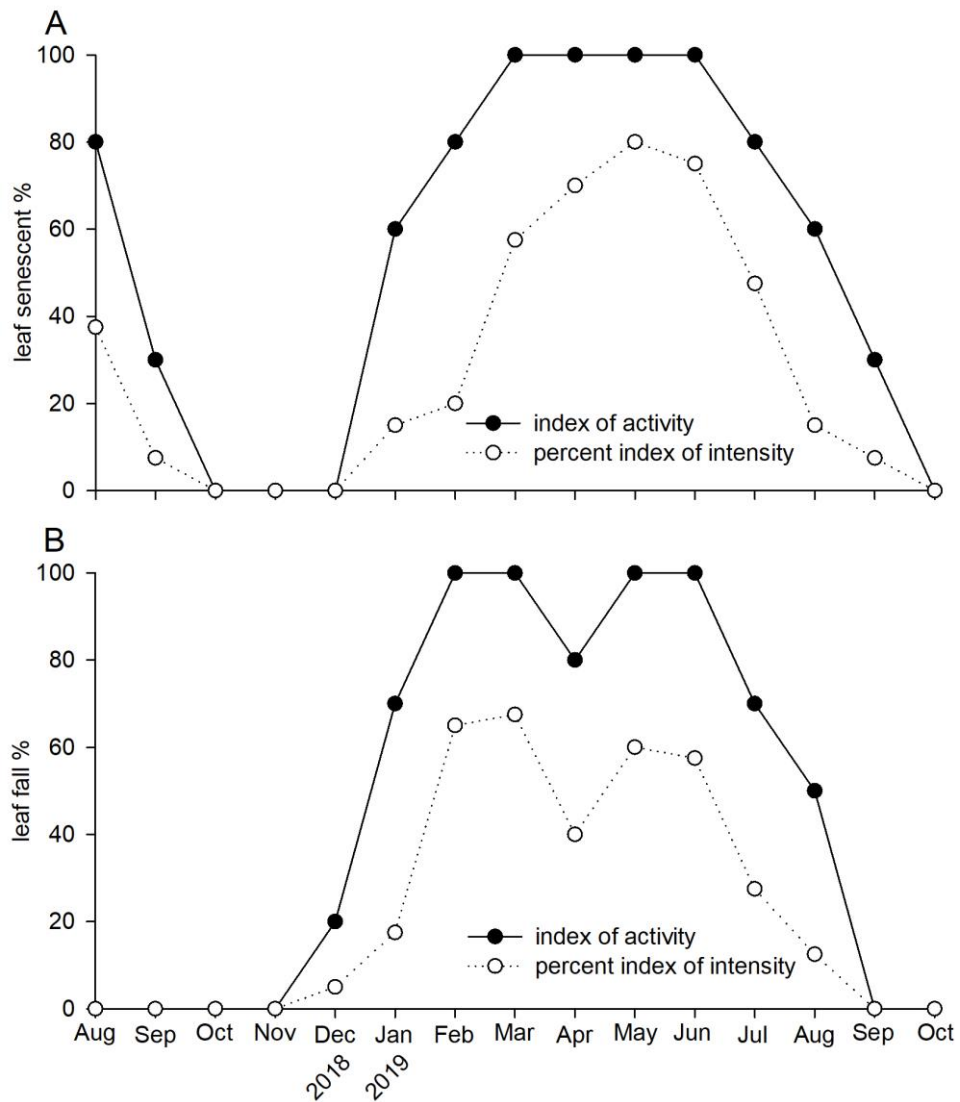


Figure 8 - Index of activity (solid line) and percent index of intensity (dotted line) for leaf fall (a) and leaf senescence (b) in a population of *Aloysia hatschbachii* evaluated between August 2018 and October 2019.

The representation of leaf fall (Figure 4-B), defined as occasional dropping of some leaves or leaves missing in-between nodes, in other words, occasional fall of some leaves (but not all), reveals that this phenophase occurred between December and September. The index of activity shows synchrony between January and August, asynchrony in December 2018 and weak synchrony in September 2019. The percent index of intensity reached a peak in February and March, just above 60%, and another again in May and June, near 60%. Leaf fall was not observed in September, October or November, which coincides with the time of intensive budding, hence no leaf fall.

Tables 1 and 2 illustrate Pearson correlation to explain the effect of meteorological variables on the phenological phases of species *Aloysia hatschbachii*. A significant correlation confirms there to be a relationship between the potential effect of environmental conditions on the phenological events expressed by the population.

Table 3: Pearson correlation between meteorological variables and phenological phases, for index of activity. (T = average monthly air temperature; m T = minimum monthly air temperature; M T = maximum monthly air temperature; RH = average monthly relative humidity; SR = average incident monthly solar radiation; bu = budding; fl = flowering; fr = fruiting; lf = leaf fall; ls = leaf senescence).

Weather variables	Phenological phases				
	bu	fl	fr	lf	ls
T (°C)	0.339 ^{ns}	0.740 ^{**}	0.584 [*]	0.082 ^{ns}	-0.309 ^{ns}
m T (°C)	0.247 ^{ns}	0.696 ^{**}	0.622 [*]	0.181 ^{ns}	-0.215 ^{ns}
M T (°C)	0.414 ^{ns}	0.787 ^{**}	0.540 [*]	-0.013 ^{ns}	-0.389 ^{ns}
RH (%)	-0.632 [*]	-0.111 ^{ns}	0.379 ^{ns}	0.607 [*]	0.641 ^{**}
SR (MJ m ²)	0.438 ^{ns}	0.681 ^{**}	0.365 ^{ns}	-0.331 ^{ns}	-0.458 ^{ns}

*Significant (0.01 %) by the t test; ** Significant (0.05%) by the t test; ^{ns}Not significant.

Table 4: Pearson correlation between meteorological variables and phenological phases, for percent index of intensity. (T = average monthly air temperature; m T = minimum monthly air temperature; M T = maximum monthly air temperature; RH = average monthly relative humidity; SR = average incident monthly solar radiation; bu = budding; ml = mature leaves; fl = flowering; fr = fruiting; lf = leaf fall; ls = leaf senescence).

Weather variables	Phenological phases					
	bu	ml	fl	fr	lf	ls
T (°C)	0.343 ^{ns}	-0.068 ^{ns}	0.732 ^{**}	0.519 [*]	0.093 ^{ns}	-0.323 ^{ns}
m T (°C)	0.289 ^{ns}	-0.001 ^{ns}	0.691 ^{**}	0.547 [*]	0.196 ^{ns}	-0.199 ^{ns}
M T (°C)	0.355 ^{ns}	-0.131 ^{ns}	0.782 ^{**}	0.488 ^{ns}	-0.020 ^{ns}	-0.454 ^{ns}
RH (%)	-0.427 ^{ns}	0.188 ^{ns}	-0.116 ^{ns}	0.326 ^{ns}	0.620 [*]	0.718 ^{**}
SR (MJ m ²)	0.314 ^{ns}	-0.533 [*]	0.713 ^{**}	0.317 ^{ns}	-0.362 ^{ns}	-0.641 ^{**}

*Significant (0.01 %) by the t test; ** Significant (0.05%) by the t test; ^{ns}Not significant.

Average air temperature (T °C) had a significant positive correlation with flowering and fruiting, strong and moderate respectively, both for index of activity (Table 1) and for percent index of intensity (Table 2), but no correlation with the other phenological phases. Average minimum and maximum temperatures followed the same trend, having significant positive correlations with flowering and fruiting, again strong and moderate respectively, for index of activity. As for the percent index of intensity, average minimum temperature had a moderate positive correlation with flowering and fruiting, while average maximum temperature had a significant strong positive correlation only with flowering, which suggests that flowering is induced by increasing temperatures.

Relative air humidity (RH%) had a moderate negative correlation with budding, negatively affecting the index of activity, that is, there is antagonism between the two (Table 1). But it had a moderate positive correlation with leaf fall (lf) and with leaf senescence (ls), indicating that the index of activity increases with increasing

RH%. As for percent index of intensity, results reveal a positive correlation with leaf fall and with leaf senescence, moderate and strong respectively.

Average monthly global incident solar radiation had a significant moderate positive correlation with flowering, for index of activity only (Table 1). As for percent index of intensity (Table 2), solar radiation had a moderate negative correlation with mature leaves and with leaf senescence but a strong positive correlation with flowering, which indicates that flowering intensifies with increasing global incident solar radiation.

4.6 Discussion

The budding phase in species *A. hatschbachii* was found to be negatively correlated with relative air humidity for index of activity, that is, most of the budding event occurs in the months with low relative air humidity. The budding phase had a peak index of activity and peak intensity between October and December but ceased in periods of high relative humidity. Likewise, *Vernonia polyanthes* and some other tree species from southeastern Brazil also revealed a negative correlation between humidity and budding (GOMES, 2017; AZEVEDO et al., 2014). In 2019, budding started earlier, in August, while in 2018 it was observed in September, noting that relative humidity levels in August 2019 were lower, which possibly may have caused the budding phase to start earlier. A phenological study on grasslands of southern Brazil revealed that growth rates decline during the cold season due to low temperatures and reduced daylight, combined with excess humidity (TRENTIN & FONSECA, 2011).

Length of daylight may be a determinant of how long a leaf stays attached to the branch. Some authors found that leaf longevity is reduced with increasing light intensity (HARLOW et al., 2005; VINCENT, 2006), though the reverse may also be true, as intense shading could induce leaf senescence (MARENCO et al., 2019). Studying the phenology of Amazonian plant *Pseudobombax munguba*, the above authors also found that leaf fall could be related to increasing insolation. and, consequently, to solar radiation. What happens is that the aging process in leaves subjected to low light intensity takes longer, a result of slow photosynthetic metabolism (VICENT, 2006). The mature leaves phase of *A. hatschbachii* reached a peak percent index of intensity when the global incident solar radiation was less intense, i.e. June, July and August, which may have favored a slow photosynthetic metabolism and consequently caused mature leaves to stay longer attached to the branch. Increased senescence in around May, in association with reduced global incident solar radiation, may also be related to the life span of leaves.

In subtropical regions such as southern Brazil, reproductive phenophases (flowering and fruiting) may be associated with stimulus from rising temperatures and photoperiod (TALORA & MORELLATO, 2000; FERRERA et al., 2017). While photoperiod is a critical factor for annual plants, temperature affects flower development particularly in woody species and in perennial herbs adapted to a temperate climate (RATHCKE & LACEY, 1985). Talora & Morellato (2000) found flowering induction to be associated with air temperature in some Atlantic Forest species. Some authors reported peak flowering rates in November in some forest species of southern

Brazil, which is when air temperature rises and the length of daylight is longer, having found a significant correlation of these two meteorological variables with reproductive phenophases (ATHAYDE et al., 2009). Also, Ferrera et al. (2017) found that the anthesis phase (fully open flowers) had a correlation with length of daylight hours and with air temperature. The onset of the flowering phase in *A. hatschbachii*, which occurred in November, coincides both with rising temperatures and with increasing global incident solar radiation, revealing a significant positive correlation. Siedo (2006) also compiled data on the flowering phase of this species and found that it occurs from November to February. Other plant material occurring occasionally in Rio Grande do Sul was found to manifest flowering and fruiting events in October and from January to March (CRESPAM, 2010), which coincides with the findings in this study. Another study in a native forest of Argentina on the flowering phase of species *A. virgata* and *A. gratissima*, both belonging in the same genus, revealed that both species manifested the phenophase between November and April (CABRERA et al., 2013).

The fruiting phenophase in *A. hatschbachii* was found to reach peak intensity in February and March, immediately following the peak flowering period. The phenophase started in December and extended until April, despite showing uneven fruit ripening, which may otherwise have a positive side as an indicator of an extended period for seed production and thus a good opportunity for natural propagation of the species. The correlation between fruiting and climate variables was significant for the parameter temperature which, similarly to flowering, was observed in the period of high temperatures.

Similarly to budding, leaf fall and leaf senescence were found to correlate with relative air humidity, intensifying in activity and in intensity with rising relative air humidity throughout the assessed period. Increasing relative humidity affects plant transpiration in a decreasing order (KUPPER et al., 2011), as it likely disturbs the absorption of mineral nutrients by plant roots, diminishing nutrient supply to the leaves and perhaps even leading to a decline in photosynthesis (PARTS et al., 2013; SELLIN et al., 2013).

4.7 Conclusion

The budding phase occurred throughout virtually the entire assessed period in species *Aloysia hatschbachii*, except between May and July, when it ceased. Budding revealed synchrony between September and December and was influenced by relative air humidity.

The mature leaves phase was present all year round in the plant specimens, with an index of activity revealing high synchrony, and the phase was influenced by incident solar radiation.

Leaf senescence and leaf fall in *Aloysia hatschbachii* had a low percent index of intensity, indicating leaf permanence on the branch throughout the assessment period, which points to its nondeciduous characteristic, being influenced by relative air humidity and by global incident solar radiation.

The flowering phase in *Aloysia hatschbachii* occurred from November to April, while the fruiting phase occurred from December to May, both showing synchrony, for two and three months respectively. The reproductive period was influenced by air temperature and by incident solar radiation.

The ideal period of leaf material collection can be indicated between the months of March and June, due to the higher intensity period of the phenophase of mature leaves, with the phenophase of sprouting in low intensity and increased intensity of senescence and leaf fall.

Acknowledgment

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes - CAPES) (Brasília, DF, Brazil).

4.8 References

- ALVARES, CA, STAPE, JL, SENTELHAS, PC, GONÇALVES, JLM, SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 2013;22(6):711-728.
- ANDREIS, C, LONGHI, SJ, BRUN, EJ, WOJCIECHOWSKI, JC, MACHADO, AA, VACCARO, S, CASSAL, CZ. Estudo fenológico em três fases sucessionais de uma floresta estacional decidual no município de Santa Tereza, RS, Brasil. *Rev. Árvore.* 2005;29(1):55-63.
- ANWAR, MR, LIU, DL, FARQUHARSON, R, MACADAM, I, ABADI, A, FINLAYSON, J, WANG, B, RAMILAN, T. Climate change impacts on phenology and yields of five broadacre crops at four climatologically distinct locations in Australia. *Agric. Syst.* 2015;132:133-144.
- ATHAYDE, EA, GIEHL, ELH, BUDKE, JC, GESING, JPA, EISINGER, SM. Fenologia de espécies arbóreas em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, sul do Brasil. *R. bras. Bioci.* 2009;7(1):43-51.
- AZEVEDO, IFP, NUNES, YRF, ÁVILA, MAA, SILVA, DL, FERNANDES, GW, VELOSO, RB. Phenology of riparian tree species in a transitional region in southeastern Brazil. *Braz. J. Bot.* 2014;37(1):47-59.
- BENKE, CSC, MORELLATO, LPC. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Braz. J. Bot.* 2002;25(3):269-275.
- BERGAMASCHI, H. O clima como fator determinante da fenologia das plantas. In: REGO, GM, NEGRELLE, RRB, MORELLATO, LC. Fenologia ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo: Embrapa Florestal 1ª ed; 2007. p. 291-310.
- BOTTA, SM. Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). *Darwiniana* 1979;22(1/3):67-108.
- CABRERA, M, ANDRADA, A, GALLEZ, L. Floración de espécies com potencial apícola en el Bosque Nativo Formosoño, Distrito chaqueño Oriental (Argentina). *B. Soc. Argent. Bot.* 2013;48(3-4):477-491.
- CARVALHO JÚNIOR, WGO, MELO, MTP, MARTINS, ER. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2011;13(2):223-229.
- CHAMBERS, LE, ALTWEGG, R, BARBRAUD, C, BARNARD, P, BEAUMONT, LJ, CRAWFORD, RJM, DURANT, JM, HUGHES, L, KEATLEY, MR, LOW, M, MORELLATO, PC, PLOCZANSKA, ES, ROUPPOLO, V, VANSTREELS, RET, WOEHLE, EJ, WOLFAARDT, AC. Phenological changes in the southern hemisphere. *PLoS One.* 2013;8(10):e75514.

- CNCFlora. *Aloysia hatschbachii*. In: Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. [Internet]; 2012; Brasil. 2010. [cited 2019 april 23]. Available from: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Aloysiahatschbachii>.
- CRESPAM PC. Estudos na família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil [dissertation]. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Botânica/UFRGS. 2010. 115 p.
- CRUZ, CD. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Sci. Agron. 2013;35(3):271-276.
- FERRERA, TS, PELISSARO, TM, EISINGER, SM, RIGHI, EZ, BURIOL, GA. Fenologia de espécies nativas arbóreas na região central do estado do Rio Grande do Sul. Cienc. Florest. 2017;27(3):753-766.
- FIRMO, WCA, MENEZES, VJM, PASSOS, CEC, DIAS, CN, ALVES, LPL, DIAS, ICL, SANTOS NETO, M, OLEA, RSG. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. Cad. Pesqui. 2011;18:90-95.
- FISCH, STV, NOGUEIRA JUNIOR, LR, MANTOVANI, W. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na mata atlântica (reserva ecológica do trabiju, Pindamonhangaba – SP). Rev. Biociênc. 2000;6(2):31-37.
- FOURNIER, LA, CHARPANTIER, C. El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones em el estudio de las características fenológicas de las árboles tropicales. Turrialba. 1975;25(1):45-48.
- FOURNIER, LA. Um método quantitativo para la medicino de características fenológicas em árvores. Turrialba. 1974;24(1):422-423.
- GERAUD G, SPIERINGS EL, KEYWOOD C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache. 2002;42 Suppl 2:S93-9.
- GODOY, R, DELIZA, R, GHENO, L, LICODIEDOFF, S, FRIZON, C, RIBANI, R, SANTOS, G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and tradicional mate tea products. Food Res. Int. 2013;53(2):801-807.
- GOMES JAO. Estudos complementares ao manejo de assa-peixe (*Vergonia polyanthes* Less.): Fenologia, fitoquímica, histoquímica, anatomia e variação sazonal em população nativa [thesis]. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP; 2017. 88 p.
- GOURLART, MF, PEREIRA, JÁ, ROCHA, AS. Fenologia de uma comunidade arbustiva em campo rupestre. In: 64° Congresso Nacional de Botânica [Internet]; 2013 November 10-15; Belo Horizonte; Brasil. 2000. [cited 2019 dec 30]. Available from: <https://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins18712-id4498.pdf>.
- HARLOW, BA, DUURSMA, RA, MARSHALL, JD. Leaf longevity of western red cedar (*Thuja plicata*) increases with depth in the canopy. Tree Physiol. 2005;25(5):557-562.
- KUARAKSA, C, ELLIOTT, S, HOSSAERT-MCKEY, M. The phenology of dioecious Ficus spp. tree species and its importance for forest restoration projects. Forest Ecol. Manag. 2012;265:82-93.
- KUPPER, P, SÖBER, J, SELLIN, A, LÖHMUS, K, TULLUS, A, RÄIN, O, LUBENETS, K, TULVA, I, URI, V, ZOBEL, M, KULL, O, SÖBER, A. An experimental facility for free air humidity manipulation (FAHM) can alter water flux through deciduous tree canopy. Environ. Exp. Bot. 2011;72(3):432-438.
- LIMA, ALA, RODAL, MJN. Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. J. Arid Environ. 2010;74(11):1663-1373.
- LIMA, RK, CARDOSO, MG, Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. Revista Fitos. 2007;3(3):14-24.
- LIRA, PDL. 2016. Caracterización fitoquímica del cedrón (*Aloysia citrodora* Paláu, Verbenáceas) en Argentina para su normalización [thesis]. Buenos Aires: Facultad de Farmacia y Bioquímica/Universidad de Buenos Aires; 2016. 179 p.
- LOPES, ILM, JARDIM, MAG. Fenologia, biologia floral e germinação de plantas aromáticas: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) e *Mansoa standleyi* (Steud.) A. H. Gentry (Biononiaceae). Museu paraense Emilio Goeldi. Rev. Bras. Farm. 2008;89(4):361-365.
- LU-IRVING, P, O'LEARY, N, O'BRIEN, A, OLMSTEAD, RG. Resolving the genera *Aloysia* and *Acantholippia* within tribe Lantaneae (Verbenaceae), using chloroplast and nuclear sequences. Syst. Bot. 2014;39(2):644-655.

- MACHADO NC. Aspectos fenológicos de espécies arbóreas e arbustivas em formação vegetacionais abertas no parque nacional da restinga de Jurubatiba, Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil [dissertation]. Macaé: Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação/UFRJ; 2013. 83 p.
- MARENCO, RA, SOUZA, FF, OLIVEIRA, MF. Leaf phenology, growth and photosynthesis in *Pseudobombax munguba* (Malvaceae). Rev. Ceres. 2019;66(1):001-010.
- MARTIN-GAJARDO, IS, MORRELLATO, LPC. Fenologia de rubiaceae do sub-bosque em Floresta atlântica no sudeste do Brasil. Rev. Bras. Bot. 2003;26:299-309.
- MORAIS LAS, CASTANHA, RF, CATINI, AL. Caracterização química do óleo essencial de Alfazema do Brasil coletada em Paty do Alferes - Rio de Janeiro. Hortic. Bras. 2012;30:S2183-S2188.
- MORELLATO, LPC, TALORA, DC, TAKAHASI, A, BENCKE, CC, ROMERA, EC, ZIPPARRO, VB. Phenology of atlantic rain forest trees: A comparative study. Biotropica. 2000;32(4b):811-823.
- MORONI, P, O'LEARY, N. Aloysia. In Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [Internet]; 20..; Brasil. 20.. [cited 2019 dec 30]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15127>.
- MÚLGURA, ME, ROTMAN, AD, ATKINS, S. Verbenaceae. Flora fanerogâmica argentina. Proflora, Argentina, 2003;84:253 p.
- MÚLGURA, ME. *Verbenaceae*. In: Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. II. p.1-34. [Internet]; 2007; Brasil. 2007. [cited 2019 dec 30]. Available from: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=hatschbachii&genero=Aloysia&espcod=179329>.
- NEUMANN, MK, SCHNEIDER, PH, SCHMITT, JL. Phenology, caudex growth and age estimation of *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin (Cyatheaceae) in a subtropical forest in southern Brazil. Acta Bot. Bras. 2014;28(2):274-280.
- O'LEARY, N, LU-IRVING, P, MORONI, P, SIEDO, S. Taxonomic revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae). Ann. Missouri Bot. 2016;101(3):568-609.
- OLIVEIRA JÚNIOR, AR, JARDIM, MAG, ZOGHBI, MGB. Fenologia, germinação de sementes e desenvolvimento morfológico de plantas aromáticas da Amazônia: 1. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Rev. Bras. Farm. 2007;88(2):71-73.
- PARTS, K, TEDERSOO, L, LOHMUS, K, KUPPER, P, ROSENVALD, K, SÓBRIO, A, OSTENEM, I. Increased air humidity and understory composition shape short root traits and the colonizing ectomycorrhizal fungal community in silver birch stands. Forest Ecol. Manag. 2013;310:720-728.
- PIRANI, FR, SANCHEZ, M, PEDRONI, F. Fenologia de uma comunidade arbórea em cerrado sentido restrito, Barra do Garças, MT, Brasil. Acta Bot. Bras. 2009;23(4):1096-2009.
- PROCHNOW, D, ALTISSIMO, BS, SILVA, JC, MEIRA, D, CARON, BO, HEINZMANN, BM, SCHMIDT, D. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát. 2017;16(2):121-128
- RICCIARDI, G, TORRES A, NASSIFF AA, RICCIARDI A, BAREN, CV, BANDONI, A. Examen del aceite esencial de "niño rupá" (*Aloysia gratissima*) Tronc. del Nordeste Comunicaciones. Científicas y Tecnológicas. 2000;8:93-97.
- RICCO, RA, WARGNER, ML, PORTMANN, E, REIDES, C, LLESUY, S, GURNI, AA, CARBALLO, MA. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát. 2010;9(5):388-396.
- RICHARDSON, AD, KEENAN, TF, MIGLIAVACCA, M, RYU, Y, SONNENTAG, O, TOOMEY, M. Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. Agr. Forest Meteorol. 2013;169:156-173.
- SEGECIN, S. Morfoanatomia das folhas cotiledonares, protofilo e metafilo de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). Akropolis. 1995;3:21-29.

- SELLIN, A, TULLUS, A, NIGLAS, A, ÕUNAPUU, E, KARUSION, A, LÕHMUS, K. Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (*Betula pendula*). *Ecol. Res.* 2013;28(3):523-535.
- SGARBOSSA, J, SCHMIDT, D, SCHWERZ, F, SCHWERZ, L, PROCHNOW, D, CARON, BO. Effect of season and irrigation on the chemical composition of *Aloysia triphylla* essential oil. *Rev. Ceres.* 2019;66(2):085-093.
- SIEDO SJ. Systematics of *Aloysia* (Verbenaceae) [dissertation]. Austin; University of Texas; 2006. 309 p.
- TALORA, DC, MORELLATO, PC. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Braz. J. Bot.* 2000;23:13-26.
- TRENTIN, CB, FONSECA, EL. Monitoramento da fenologia da vegetação campestre do bioma Pampa e sua relação com a temperatura média do ar. In: Anais XV simpósio brasileiro de sensoriamento remoto – SBSR [Internet]; 2011 April 30-31; Curitiba; Brasil. 2011. [cited 2019 dec 30]. Available from: <http://marte.sid.inpe.br/col/dpi.inpe.br/marte/2011/07.13.19.44/doc/p0808.pdf?metadatarpository=&mirror=urlib.net/www/2011/03.29.20.55>.
- VANDRESEN, F, SCHMITT, E, KATO, L, OLIVEIRA, CMA, AMADO, CAB, SILVA, CC. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. *Braz. J. Pharmacog.* 2010;20(3):317-321.
- VINCENT, G. Leaf life span plasticity in tropical seedlings grown under contrasting light regimes. *Ann. Bot.* 2006;97(2):245-255.
- WRIGHT, SJ, CALDERON, O. Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. *J. Ecology.* 1995;83(6):937-948.

5 ARTIGO III - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia hatschbachii* MOLDENKE.

5.1 RESUMO: O gênero *Aloysia* apresenta elevado potencial de produção de óleo essencial. *Aloysia hatschbachii* conta com características como densa cobertura de tricomas, o que remete à espécie a capacidade de produção deste metabólito secundário. O óleo essencial apresenta várias aplicações a partir do conhecimento de sua composição. A partir disto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o rendimento e a caracterização da composição do óleo essencial da espécie *Aloysia hatschbachii*. As plantas foram cultivadas na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen – RS, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019. A extração do óleo essencial foi realizado a partir de hidrodestilação em Clevenger, a partir de folhas frescas. Após extração, a massa do óleo essencial foi pesada em balança de precisão e armazenado em frascos e acondicionados em freezer para posterior análise a partir da Cromatografia gasosa. A identificação dos constituintes foi realizada a partir do índice de retenção e a porcentagem de cada componente a partir da área do determinado pico em comparação com a área total de todos os picos. O rendimento médio do óleo essencial foi de 1,171%, considerado elevado em comparações com outras espécies do mesmo gênero botânico. Os principais componentes são classificados como sesquiterpenoides, representando 86% da composição. Em concentração menor foram encontrados os monoterpenos (4,84 %) e fenilpropanóides (0,40 %). Os componentes de maior concentração do óleo essencial da espécie *Aloysia hatschbachii* foram β -Elemene e Germacrene B, representando 22,6 %, com potencial atividade antimicrobiana devido a concentração de sesquiterpenos de forma majoritária, assim futuros estudos sobre o óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* torna-se promissores.

Palavras chave: Metabólitos secundários, sesquiterpenóides, oxido de cariofileno, β -Elemeno.

YIELD AND COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF *Aloysia hatschbachii* MOLDENKE.

5.2 ABSTRACT: Genus *Aloysia* has high potential for essential oil production. A distinctive characteristic of species *Aloysia hatschbachii* is that it is densely covered with trichomes, signaling its capability of producing this secondary metabolite. Essential oil has several applications which can be

determined once its composition is known. Therefore, this study aims to evaluate both the yield and the composition of essential oil from species *Aloysia hatschbachi*. Plant specimens were cultivated in the experimental site of the Federal University of Santa Maria, Frederico Westphalen Campus, in Rio Grande do Sul state, from March 2018 to February 2019. The essential oil was extracted through hydrodistillation of fresh leaves, using a Clevenger apparatus. The resulting essential oil was weighed on a precision scale, placed in vials and stored in a freezer for further analysis using gas chromatography. The identification of constituents was based on the retention index and on the percentage of each component by comparing the area under its peak to the total area of all peaks. The average yield of essential oil was 1,171%, which is considered a high content in comparison with other species in the same botanical genus. The main components found were sesquiterpenoids, representing 86% of the compound. Also found, though in lower concentrations, were monoterpenes and phenylpropanoids, 4,84% and 0,40% respectively. The constituents found in the highest concentrations were β -Elemene and Germacrene B, representing 22,6%, with potential antimicrobial activity due to the concentration of sesquiterpenes in a majority form, thus future studies on the essential oil of *Aloysia hatschbachii* become promising.

Key words: Secondary metabolite, sesquiterpenoids, caryophyllene oxide, β -Elemene.

5.3 INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae compreende cerca de 100 gêneros, com aproximadamente 2.600 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e moderadas (O'LEARY et al., 2012; PORTMANN et al., 2012). Pertencente à família, o gênero *Aloysia* ocorre em uma área territorial entre a América do Norte e do Sul, com aproximadamente 30 espécies (ROJAS et al., 2012). Juntamente com o gênero *Lippia*, ambos apresentam grande importância e são muito utilizados na medicina tradicional e popular (RICCO et al., 2010). No Brasil, a família Verbenaceae é utilizada tanto como fonte de alimento, como ornamental, na forma de medicamentos, cosméticos e outros (BADKE et al., 2012). Uma das principais e mais marcante característica das Verbenaceae é a presença de tricomas secretores, tais quais com potencial produção de óleos essenciais de grande valor medicinal (FAVORITO, 2009), sendo eles tanto tricomas simples como glandulares, os quais são comuns na família, como a *Aloysia triphylla*, que possuem a presença de tricomas glandulares e de óleos essenciais (CALZADA-SÁNCHEZ et al., 2014).

Óleo essencial (OE) são constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, os quais são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas (BIZZO;

HOVEL; RESENDE, 2009). Os óleos essenciais de plantas da família Verbenaceae sul-americanas, contém alguns componentes do grupo dos monoterpenos e sesquiterpenos como o thymol, β -caryophyllene, citral, 1,8-cineole, carvone e limonene e são componentes que alteram ou aumentam a permeabilidade das membranas bacterianas, explicando assim as ações antimicrobiano (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018). É possível esperar uma atividade biológica semelhante de metabólitos secundários em plantas filogeneticamente relacionadas (MONTANARI et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Aloysia* apresentam os sesquiterpenos oxigenados (40%-50%) como grupo principal e moléculas sesquiterpênicas como segundo grupo mais importante (30-40%), com por exemplo 4-dieno e β -cariofileno, respectivamente de cada grupo, mas também apresentando monoterpenos, como o Linalol (ARZE et al., 2013; SANTOS et al., 2013; GARCIA et al., 2018). A exemplo, a espécie *Aloysia triphylla* apresenta atividade antibacteriana, digestiva, antiespasmódica, entre outros (MERÉTIKA et al., 2010), além do emprego em psicultura na forma de anestésico e aditivo alimentar (DANIEL et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2015; ZEPPENFELD et al., 2017).

A *Aloysia hatschbachii* Moldenke é uma planta endêmica, de origem no estado do Paraná-BR (SEGECIN, 1995; SIEDO, 2006; MÚLGURA, 2007), citada como espécie de nova ocorrência no Rio Grande do Sul-BR (CRESPAM, 2010). Esta espécie apresenta tricomas em ambas as faces (SEGECIM, 1995), além da distribuição desses apêndices em outras estruturas da planta (nervuras, ramos e flores), sugerindo potencial produção de óleo essencial por outras estruturas. Siedo (2006) e Crespam (2010) sugerem que a espécie seja semelhante a *Aloysia lycioides*, *Aloysia polygalifolia*, *Aloysia brasiliensis*, *Aloysia cordata* e *Aloysia chamaedryfolia*. A composição majoritária do óleo essencial das espécies *A. lycioides* e *A. chamaedryfolia*, espécies semelhantes a *A. hatschbachii*, apresentam monoterpenos oxigenados (60,2% e 17,1%, respectivamente), como por exemplo o espathulenol ((-) Spathulenol) e elemol (α -Elemol) entre os componentes principais, respectivamente de cada espécie, e para a *A. polygalifolia* foram observados hidrocarbonetos sesquiterpenos (43,5%) como componentes majoritários, como β -Cariofileno (β -Caryophyllene) entre a composição (THOMAS, 2017).

O Composto β -Cariofileno (β -Caryophyllene) constituinte do óleo essencial de *A. polygalifolia* (THOMAS, 2017), também presente na *Aquilaria crassna* pode ser um potencial agente antifúngico, com propriedades citotóxicas contra células cancerígenas colorretais (DAHAM et al., 2015), composto este presente também em *Aloysia citriodora* cultivada no

Marrocos, apresentando atividade citotóxica e antibacteriano do óleo essencial (OUKERROU et al., 2017), demonstrando a importância de certas moléculas que compõem estes metabolitos secundários. Outra importante constatação é a influência das variáveis climáticas na composição do óleo essencial. Através de uma Correlação de Pearson, Prochnow et al. (2019) contatou a correlação entre as variáveis climáticas e a produção e composição do óleo essencial de *Aloysia citriodora*, como é o caso da temperatura influenciando no teor de óleo e a síntese de limoneno e espathulenol. Neste mesmo estudo, outros compostos também foram identificados, tais como linalol, β -Citral, α -Citral e óxido de cariofileno.

A produção de óleo essencial, diferente de outros tipos de produção agrícola, presume-se na elevada qualidade, mas buscando também assegurar a rentabilidade e a sustentabilidade (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2014). No Brasil, o estado do Paraná possui longa tradição no cultivo de plantas aromáticas, atendendo cerca de 90% da demanda nacional, com um rendimento bruto de 12 milhões de reais no ano de 2013 com o cultivo e constante expansão da área explorada no estado, não somente devido à elevada demanda, mas por estímulo a agricultura sustentável por parte do Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural do Paraná (EMATER) (CORRÊA JÚNIOR & SCHEFFER, 2014).

A partir destes pressupostos, o objetivo do trabalho foi avaliar o rendimento e caracterizar a composição do óleo essencial da planta aromática *Aloysia hatschbachii*, de material coletado a partir de plantas mantidas sob cultivo em estufa na região de Frederico Westphalen – RS.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material vegetal (folhas) de *Aloysia hatschbachii* para a extração foi realizado em plantas sob cultivo em estufa na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* Frederico Westphalen (27°23'26" S; 53°25'43" W; 461 MSL), em 18 de fevereiro de 2019. Segundo a classificação climática de Köppen, a região apresenta clima do tipo Cfa, com estações bem definidas durante o ano e chuvas bem distribuídas (ALVARES et al., 2013).

A coleta foi realizada em plantas adultas, compondo quatro amostras (quatro exemplares de plantas). Ao final de cada coleta, a extração do óleo essencial foi realizada a partir de folhas frescas por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, disponível no Laboratório de Cultura de Tecidos e Extrativos Aromáticos, durante o período de três horas após a identificação do processo de fervura. Após o processo, o extrato obtido foi

acondicionado em frascos escuros e mantidos refrigerados. As amostras foram compostas por massa fresca, variando de acordo com a disponibilidade de folhas. As avaliações se deram a partir do teor e caracterização química do óleo essencial.

A determinação do teor de óleo foi realizada a partir da relação entre massa do óleo e massa fresca total de folhas (Eq. 3), expresso em porcentagem.

$$T(\%) = \left(\frac{\text{Massa do óleo(g)}}{\text{Massa fresca de folhas (g)}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Extratos Vegetais da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* Sede Santa Maria, através da cromatografia gasosa. A análise por GC-MS TIC foi realizada usando cromatógrafo a gás Agilent 6890 acoplado com detector seletivo de massa Agilent 5973, com 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 MI/min de fluxo; temperatura do injetor e detector, 220 °C; temperatura interface de 250 °C.

A identificação dos constituintes foi realizada a partir do índice de retenção (IR) e dos modelos de fragmentação de espectro de massas em comparação com os dados da literatura (NIST, 2018; ADAMS, 2009). Para a concentração dos constituintes, a mesma foi calculada utilizando a área total dos seus picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, a qual foi obtida por análise cromatográfica de gás, com detector de chama (DIC), expressando o resultado em porcentagem.

O teor de óleo e composição foram apenas tabelado quanto aos respectivos valores, sem análise estatística, configurando assim, uma caracterização da composição química e teor do óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* sob cultivo em Frederico Westphalen -RS.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de óleo (%) da espécie apresentou elevado teor em comparação a outras espécies. A Tabela 1 mostra o teor do óleo (%) da *Aloysia hatschbachii* de quatro plantas avaliadas, demonstrando o rendimento em relação a massa de óleo extraído o qual variou de 1,062% a 1,312%, com média geral de 1,171%.

Tabela 1 - Teor (%) de óleo essencial em quatro amostras de *Aloysia hatschbachii* (P-1, P-2, P-3 e P4) cultivadas em condições de estufa em Frederico Westphalen-RS (2018-2019).

Amostra (planta)	Teor (%)
P-1	1,062
P-2	1,125
P-3	1,312
P-4	1.187
Média	1,171

A caracterização do rendimento da espécie demonstra que a espécie apresentou elevado teor de óleo essencial em comparação com outras espécies do mesmo gênero. Alguns rendimentos encontrados na literatura relatam variabilidade no rendimento do teor. O teor do OE de *Aloysia citriodora* em diferentes estações do ano variou desde 0,32% a 0,55% (SCHWERZ et al., 2015). Paulus et al. (2013), utilizando a mesma espécie, em diferentes espaçamentos observaram rendimento de 0,55% a 0,14%. *Aloysia gratíssima* com rendimento entre 2,10 a 2,22%, sendo avaliada sobre diferentes níveis de sombreamento (PINTO et al., 2007). Os rendimentos do OE de *Aloysia virgata*, em diferentes estações do ano apresentaram valores entre 0,3% a 0,5%, variando até mesmo a composição do OE (RICCIARDI et al., 2005).

A caracterização química do óleo essencial pode ser observada na tabela 2. Os componentes caracterizados foram, Eucalyptol, γ -Terpinene, β -Linalool, E-Ocimenol, Terpinen-4-ol, α -Terpineol, δ -Elemene, β -Elemene, Eugenol methyl ether, β -Caryophyllene, α -Caryophyllene, Aromadendrene, Germacrene D, β -Selinene, Germacrene B, , Germacrene B, α -Selinene, α -Selinene, δ -Cadinene, Longicamphenylone, α -Cedrene oxide, Spathulenol, Caryophyllene oxide, Isoaromadendrene oxide, Alloaromadendrene oxide, Cedr-8-en-13-ol, Z-Caryophyllene<14-hydroxy, Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol, 6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol, Z-Z- α -Bisabolene oxide e α -Humulene<14-hidroxy. Dentre estes componentes, os sesquiterpenóides (sesquiterpenos) apresentaram as maiores concentrações, entre 84,00% a 87,97% do óleo essencial e os monoterpenóides (monoterpenos) em menor concentrações, variando entre 2,01%, chegando a um máximo de 9,38%. Um fenilpropanóides foi observado em amostras, sendo o Eugenol methyl ether encontrado em poucas proporções (aproximadamente 0,40%).

Tabela 2 - Constituintes químicos do óleo essencial (%) de *Aloysia hatschbachii* (P-1, P-2, P-3 e P-4) cultivadas em condições de estufa em Frederico Westphalen-RS (2018-2019).

Componente	Amostra (planta)				Índice de Kovats	
	P-1	P-2	P-3	P-4	IKcalc.	IKref.
Eucalyptol	-	2,41%	-	-	1030	1031
γ -Terpinene	-	0,55%	-	-	1069	1062
β -Linalool	0,60%	0,84%	0,68%	0,68%	1099	1099
<i>E</i> -Ocimenol	0,25%	0,35%	-	0,09%	1169	1168
Terpinen-4-ol	0,65%	1,11%	0,38%	0,28%	1179	1175
α -Terpineol	3,14%	4,12%	2,29%	1,10%	1193	1193
δ -Elemene	0,22%	-	-	0,16%	1331	1329
β -Elemen	9,49%	12,95%	11,05%	11,96%	1388	1389
Eugenol methyl ether	0,48%	0,30%	0,46%	0,37%	1398	1399
β -Caryophyllene	10,08%	12,63%	7,46%	1,18%	1418	1419
α -Caryophyllene	0,93%	0,92%	1,23%	0,32%	1454	1454
Aromadendrene	-	-	-	0,25%	1458	1464
Germacrene D	0,25%	-	-	3,28%	1479	1480
β -Selinene	0,71%	0,74%	0,55%	0,99%	1487	1486
Germacrene B	11,68%	8,82%	12,91%	11,56%	1494	1495
α -Selinene	3,61%	4,32%	3,79%	3,76%	1505	1505
δ -Cadinene	-	-	-	0,19%	1516	1520
Longicamphenylone	6,94%	5,66%	7,71%	6,77%	1562	1563
α -Cedrene oxide	7,14%	5,61%	7,72%	7,28%	1568	1575
Spathulenol	1,17%	1,08%	1,10%	3,05%	1574	1576
Caryophyllene oxide	1,48%	1,23%	1,72%	-	1579	1581
Isoaromadendrene oxide	2,25%	1,92%	1,33%	2,59%	1592	1594
Alloaromadendrene oxide	6,37%	5,43%	4,77%	7,28%	1642	1646
Cedr-8-en-13-ol	1,92%	1,89%	2,68%	2,79%	1653	1657
Z-Caryophyllene<14-hydroxy	1,75%	1,75%	-	2,44%	1667	1667
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	8,70%	7,99%	9,39%	8,52%	1679	1680
6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	4,29%	3,89%	4,80%	4,52%	1705	1714
Z-Z- α -Bisabolene oxide	1,11%	-	-	-	1712	1704
α -Humulene<14-hidroxy	7,03%	6,87%	8,25%	9,09%	1722	1714
Monoterpenóides	4,65%	9,38%	3,35%	2,01%		
Sesquiterpenóides	87,11%	84,00%	86,47%	87,97%		
Fenilpropanóides	0,48%	0,30%	0,46%	0,37%		
Total médio das amostras identificados	92,23%	93,67%	90,28%	90,35%		

P-1 = planta 1; P-2 = planta 2; P-3 = planta 3; P-4 = planta 4; IKcalc. = Índice de Kovats Calculado; IKref. = Índice de Kovats de Referência; - = componente não identificado.

O β -Elemeno foi o componente de maior concentração média (11,36%) e presente em todas as amostras, com o Germecreno B apresentando também elevadas concentrações

(11,24%), representando cerca de 22,6% do OE, em média. Outros componentes em elevadas concentrações também foram identificados, como o Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol (8,65%), β -Cariofileno (7,83%), α -Humulene<14-hidroxy (7,80%), óxido de α -Cedreno (7,01%) e Longicamphenylone (6,76%), sendo esses classificados como sesquiterpenos. Houve ainda a presença do fenilpropanoide Eugenol methyl ether, porém em concentrações baixas.

O β -Elemeno (β -Elemene) geralmente é encontrado em menores concentrações em OE de inúmeras plantas (BARRERO et al., 2011). Por exemplo, Rowshan & Tarakemeh (2013) realizaram um dos primeiros estudos de caracterização da composição química do OE de *Scalegeria meifolia* e entre os elementos identificados estão o β -Elemeno, limoneno e D-germacreno e, segundo os autores, são considerados componentes químicos importantes. O β -Elemeno também foi identificado em *Ocimum basilicum* L., representando entre 7,84% e 6,43% (BENEDEC; ONIGA; OPREAN, 2009), e em folhas de *Mollinedia clavigera*, em torno de 14%, assim tornando-o componente majoritário (HOMEM et al., 2015), valor este semelhante ao encontrado nas amostras da *A. hatschbachii* (11.36%), e foram observados baixas concentrações (0,51%) em *A. gratissima* (FRANCO, 2007). Dentre as características do β -Elemeno, destaca-se a atividade anticancerígena (WANG et al., 2005), que segundo as observações, tudo indica que há um efeito antiproliferativo e antineoplásico do β -Elemeno em células cancerígenas pulmonares, além de atuar em tratamentos tumorais no cérebro, suprimindo crescimento de metástases cerebrais (BARRERO et al., 2011). Este composto ocorre em poucas espécies como componente majoritário, assim o torna importante o conhecimento de plantas que apresentem a síntese deste.

Em alguns trabalhos, onde os componentes majoritários apresentam altas concentrações, como constatado por Souza et al. (2017), onde o α -cital (39,91%), E-carveol (25,36%) e limoneno (21,52%) foram os majoritários em OE de *A. citriodora* e o linalol (81.64%) em OE de *L. alba*, assim, atribui-se a eles a principal influência da atividade antimicrobiana contra *Aeromonas* spp. No presente trabalho, não houve concentrações de um ou mais componentes majoritários em destaque.

O Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol compõem o OE da *Aloysia hatschbachii*, sendo também identificado na composição do óleo essencial de *Genista quadriflora*, que apresentou alguns outros componentes (KACEM et al., 2016). Ainda, segundo estes autores, o OE apresentou atividade de inibição ao crescimento de fungos e bactérias, o que pode ser resultado de uma atividade combinada dos componentes, sugerindo a possibilidade do uso do OE de *G. quadriflora* como um novo fármaco para tratamento de doenças infecciosas. A partir

da composição do óleo essencial da *Aloysia hatschbachii*, com concentrações dos compostos majoritários próximos de 11 %, é possível apresentar alguma atividade (como por exemplo atividade antimicrobiana) resultante de uma atividade combinada de componentes do óleo essencial desta. Para a farmacocinética, os OEs apresentam importantes estratégias de tratamento, pois o risco de bactérias desenvolverem resistência ao efeito do OE é menor devido aos múltiplos componentes, quando comparado a antibióticos (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012).

O Germacreno B foi identificado em *A. gratissima* em concentrações próximo de 10,5% de extração de OE a partir das inflorescências, valores abaixo da concentração de guaiol (19,5%), com a atividade superior aos de OE extraído das folhas, quando se buscou controle de algumas bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e leveduras, sendo em alguns casos até cinco vezes mais efetivo no controle (SANTOS, et al., 2013). Esses germacrenos, também são de grande importância para indústria de cosméticos como fragrâncias (NOGUEIRA, 2014), tanto que o germacreno D, outro composto presente no óleo essencial da *A. hatschbachii*, porém em menor concentração, é considerado um componente altamente atrativo para insetos (polinizadores), pela semelhança do esqueleto químico à feromônios sexuais de insetos (CASTRO et al., 2006).

Outros componentes constatado no OE de *Aloysia hatschbachii*, o β -Cariofileno (β -Caryophyllene), além do óxido de cariofileno, podem auxiliar no tratamento de linfoma e células de neuroblastoma, atuando como um potente agente anti-inflamatório (SAIN et al., 2014). O mesmo β -Cariofileno, em *Arabidopsis thaliana* atua contra a infecção de patógenos (bactérias), reduzindo o crescimento bacteriano, além de possível função de atrativo para polinizadores (HUANG et al., 2012). Alguns tratamentos com β -Cariofileno e β -Ciclodextrina em camundongos sugerem redução significativa na hiperalgesia (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016). Outra aplicabilidade do componente β -Cariofileno é o uso como repelente. O componente emitido por *Arabidopsis* apresentou efeito repelente em certas doses sobre insetos hemípteros, como o *Diaphorina citri*, vetor de importante doença em citros (*Candidatus liberibacter*) (ALQUÉZAR et al., 2017).

O OE da Cereja-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), apresenta ação antioxidante de até 66% e atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas como a *Staphylococcus epidermidis*, fato este que pode estar relacionado aos componentes majoritários presentes no OE, que contém além do β -Cariofileno, outros componentes como o α -copaeno e D germacreno (TOLEDO, 2018), porém, dentre os componentes majoritários

citados, tem-se conhecimento do efeito antioxidante dos elementos Germacreno D e β -Cariofileno (HEMALATHA et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017).

Em algumas espécies do gênero *Aloysia*, como a *A. gratissima* possui entre seus principais componentes do OE o β -Cariofileno (12,7%), com potencial biológico, antifúngico e antibacteriano (SANTOS et al., 2013). Em *A. citriodora*, por exemplo, o óxido de cariofileno apresentou-se entre os componentes majoritários, com atividade citóxica e antibacterianas do OE, no entanto, Oukerrou et al. (2017) enfatizam que essas atividades do OE dependem da natureza química e interação dos componentes. Em espécies de Verbenaceae do gênero *Lantana* (*L. canescens* e *L. radula*), o β -Cariofileno, devido a sua alta concentração, o torna um excelente marcador químico para a espécie (SENA FILHO et al., 2010), o que condiz com a espécie *Aloysia hatschbachii*, a qual entre as amostras avaliadas, a concentração de β -Cariofileno variou entre 12,63% e 1,18%.

Com aproximadamente 7,01%, o óxido de α -cedreno (α -Cedrene oxide) é um composto muito utilizado em pesquisas com obesidade. O óxido de α -cedreno também foi identificado na espécie *A. citriodora* Paláu, porém em concentrações baixas (HUDAIB; TAWAHA; BUSTANJI, 2013; ABUHAMDAH et al., 2015). Pesquisas em camundongos, utilizando o α -Cedrene presente no OE de algumas espécies de coníferas, observaram resultados satisfatórios como um potencial medicamento para tratamentos de obesidade por ser rapidamente distribuído para todos os tecidos (KIM et al., 2015).

A composição do óleo essencial, apesar de não apresentar elevadas elementos majoritários, o que se espera é uma interação entre os componentes. A alta concentração dos sesquiterpenos pode indicar uma importante atividade antimicrobiana (CHEN et al., 2011), sendo identificados na presente amostra de OE vários componentes com as mais variadas importâncias e aplicabilidades, como antifúngicos e antiinflamatórios, enfatizando estudos futuros e aplicabilidade do OE de *Aloysia hatschbachii*.

5.6 CONCLUSÕES

O rendimento do óleo essencial da espécie *Aloysia hatschbachii* foi de aproximadamente 1,17%.

Foram identificados cerca de 90% dos constituintes presentes no óleo essencial de *Aloysia hatschbachii*, contemplando cerca de 32 compostos, sendo 86% sesquiterpenos, 4,84% monoterpenos e ainda 0,40% de fenilpropanóides.

Os componentes majoritários do óleo essencial da espécie *Aloysia hatschbachii* foram os sesquiterpenos β -Elemeno e Germacreno B, representando 22,6% da composição. Devida a elevada concentração de sesquiterpenis (acima de 84%), o óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* apresentou potencial atividade antimicrobiana para estudos futuros.

5.7 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

5.8 REFERÊNCIA

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography: mass spectrometry**. 4. Ed. Illinois: Allured Business Media, 2009. 804 p.

ALQUÉZAR, B., et al. β -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacters*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5639, 2017.

ABUHAMDAH, S., et al. Pharmacological and neuroprotective profile of an essential oil derived from leaves of *Aloysia citriodora* Palau. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 1306-1315, 2015.

HUDAIB, M.; TAWAHA, K.; BUSTANJI, Y. Chemical profile of the volatile oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Paláu) growing in Jordan. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 5, p. 568-574.

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

ARZE, J. B. L., et al. Essential Oils from Bolivia. XI. Verbenaceae: *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and Boraginaceae: *Cordia chacoensis* Chodat. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 545-550, 2013.

CHEN, H., et al. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg Trees. **Molecules**, v. 16, p. 4884-4896, 2011.

BADKE, M. R., et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BARRERO, A. F., et al. Efficient synthesis of the anticancer β -elemene and other bioactive elemenes from sustainable germacrone. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 1118-1125, 2011.

- BENEDEC, D.; ONIGA, I.; OPREAN, R. Chemical composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* L. cultivated in Romania. **Farmacía**, v. 57, n. 5, p. 625-629, 2009
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. Óleo essencial no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, 32, 3, 588-594, 2009.
- BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 421-432, 2008.
- CASTRO, D. P., et al. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.
- CALZADA-SÁNCHEZ, E. V., et al. Anatomía de hoja y tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México. **Botanical Sciences**, v. 92, n. 4, p. 469-480, 2014
- CARNEIRO, N. S., et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017.
- CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M.C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 376-376, 2014.
- CRESPAM, P. C. **Estudos na Família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 115 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- NOGUEIRA, J. A. P. **Avaliação da Bioatividade e Estudo da Composição Química do Óleo Essencial das Folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL.** 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.
- DAHAM, S., et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.
- DANIEL, A. P., et al. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. S1205-S1211, 2014.
- FAVORITO, S. **Tricomias Secretores de *Lippia stachyoides* Cham.(Verbenaceae): Estrutura, Ontogênese e Secreção**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência – Botucatu, 2009.
- FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais-óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH**, v. 114, n. 30, p. 29-33, 2014.

- FRANCO, A. L. P. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc.(Alfazema), *Ocimum gratissimum* L.(Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L.(Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.
- GARCIA, M. C. F., et al. The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1219-1227, 2018.
- HEMALATHA, R., et al. Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1189-1198, 2016.
- HOMEM, I. C. M. **Estudo Fitoquímicos, Ensaio de Toxicidade, Atividade Larvívora, Antimicrobiana e Antioxidante das Folhas e Caules de *Mollonedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)**. 2015. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- HUANG, M., et al. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, n. 4, p. 997-1008, 2012
- KACEM, N., et al. Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 87-93, 2016.
- KIM, T. H., et al. In vivo absorption and disposition of α -cedrene, a sesquiterpene constituent of cedarwood oil, in female and male rats. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 30, n. 2, p. 168-173, 2015.
- MATOS, L. M. M. **Química de Espécies Nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae)**. 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências (Botânica)). Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MERÉTIKA, A. H. C., et al. Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 386-394, 2010.
- MONTANARI, R. M., et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.
- MÚLGURA, M. E. Verbenaceae. In: Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. II. 1-34, 2007.
<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=hatschbachii&genero=Aloysia&espcod=179329> (accessed 09 October 2019).
- NIST. National Institute of Standards and Technology. NIST, Livro de Química da Web, SRD 69. Doi: <https://doi.org/10.18434/T4D303>. Acesso em novembro de 2019.

OKUGAWA, H., et al. Effect of α -santalol and β -santalol from sandalwood on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 119-126, 1995.

O'LEARY, N., et al. 2012. Evolution of morphological traits in Verbenaceae. **American Journal of Botany**, 99, 11, 1778-1792, 2012. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200123>.

OUKERROU, M. A., et al. Chemical composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of *Aloysia citriodora* palau grown in Morocco. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2017, 2017.

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, J. E. B. P., et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

POLANCO-HERNÁNDEZ, G., et al. Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

PORTMANN, E., et al. Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) Assessment of antioxidant capacity and DNA damage. **International Journal of Toxicology**, v.31, p.192-202, 2012. Available from: <> Accessed: Ago. 09, 2019. doi: 10.1177/1091581812436726.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J., et al. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34-41, 2016.

RICCIARDI, G. A. L., et al. Essential oil of *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke from Corrientes (Argentina). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 6, p. 645-649, 2005.

RICCO, Rafael A., et al. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 5, 2010.

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.

ROWSHAN, V.; TARAKEMEH, A. Chemical composition of *Scaligeria meifolia* Boiss. essential oil from Iran. **Herba Polonica**, v. 59, n. 1, p. 29-34, 2013.

SAIN, S., et al. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agents against lymphoma and neuroblastoma cells. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current**

Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents), v. 13, n. 1, p.45-55, 2014.

SANTOS, F. M., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 583-588, 2013.

SATOU, T.; OGAWA, Y.; KOIKE, K. Relationship Between Emotional Behavior in Mice and the Concentration of (+)- α -Santalol in the Brain. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 8, p. 1246-1250, 2015.

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 plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 631-641, 2015.

SEGECIN, S. Morfoanatomia das folhas cotiledonares, protofilo e metafilo de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **Akrópolis-Revista de Ciências Humanas da UNIPAR**, v. 3, n. 11, 1995.

SENA FILHO, J. G., et al. A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 4, p. 1934578X1000500429, 2010.

SIEDO, S. J. **Systematics of Aloysia (Verbenaceae)**. 2006. 209 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) University of Texas, Austin, 2006.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

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.

TENFEN, A., et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Eugenia platysema*. **Natural Product Research**, v. 30, n.17, p. 2007-2011, 2016.

THOMAS, E. **Caracterização Química, Atividade Citotóxica e Genotóxica do Óleo Essencial de Espécies de Aloysia Paláu (Verbenaceae) do Rio Grande do Sul**. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

TOLEDO, A. G. **Composição Química e Atividades Biológicas das Folhas de Eugenia involucrata DC**. 2018. 110 p. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

WANG, G., et al. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 7-8, p. 881-893, 2005

ZAMORA, C.M.P.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1-21, 2018.

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.

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. 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.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A morfologia e anatomia da espécie *Aloysia hatschbachii* apresentou várias características comuns de plantas aromáticas do mesmo gênero botânico, e a distribuição de apêndices epidérmicos ocorreu em vários órgãos da planta, assim como na folha, flores e ramos. Os tricomas glandulares estão envolvidos na biossíntese de mucilagem, óleos essenciais, resinas e látex, secreções essas que ocorrem comumente em plantas aromáticas (ASCENSÃO, 2007). Desta forma, estruturas como flores e ramos também são passíveis de produzir óleos essenciais, pois apresentaram densa cobertura de tricomas.

A fenologia mostrou-se importante para o manejo e propagação da espécie. Azevedo et al. (2019), demonstraram que a produção de estacas de *Aloysia hatschbachii* a partir das secções apicais da planta apresentaram maior sobrevivência, fato atrelado a menor lignificação dos tecidos. Por este motivo, a fase de brotamento, por exemplo, pode servir como base de informações e assim facilitar a coleta de estacas com tecidos menos lignificados, característica comum entre os meses de outubro e dezembro, período em que a fenofase apresenta-se em alta. A frutificação ocorreu com períodos de intensa atividade entre janeiro a abril, servindo de propágulo para a espécie. Outra preocupação entre as plantas aromáticas é a disponibilidade de material para a extração de óleos essenciais. Para a fenofase de folhas maduras, foi possível observar índice de atividade máximo durante o ano todo e percentuais de intensidade acima de 50%, tornando-a promissora em relação a disponibilidade de material vegetal. Em relação a propagação da espécie, é importante frisar que outros estudos deverão ser realizados para avaliar o pegamento de estacas e a germinação de sementes.

Atrelado a presença de tricomas, a planta apresentou elevado teor de óleo essencial em suas folhas, extraído através da hidrodestilação, com rendimento de 1,17%. Prochnow et al. (2017), em seu estudo com *Aloysia citriodora* observaram teores de 0,17 a 0,55%. Thiesen (2019) observou que *Aloysia citriodora*, sob disponibilidade hídrica e sazonalidade, apresentou teor de óleo entre 0,65% à 0,99%, além de apresentar diferença, resultado da sazonalidade e disponibilidade hídrica, o que pode ser um indicativo que o teor e a composição do óleo essencial da *Aloysia hatschbachii* pode apresentar diferença devido a sazonalidade. Foram identificados sesquiterpenos (86%), monoterpenos (4,84%) e ainda, fenilpropanóides (Eugenol methyl ether) no OE de *Aloysia hatschbachii*. Entre os sesquiterpenos de maior concentração, β -Elemene e Germacrene B, representaram 22,6% da composição e pode apresentar potencial de aplicabilidade na área farmacologia, pois são

componentes muito utilizados em pesquisas na área de medicamentos e saúde (KIM et al., 2015; HEMALATHA et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017), além do potencial em apresentar atividade antimicrobiana, devido a alta concentração de sesquiterpenos no óleo essencial da espécie. Para isso, os estudos com o óleo essencial da *Aloysia hatschbachii* são promissores, necessitando de maiores investigações.

7 CONCLUSÃO GERAL

A *Aloysia hatschbachii* apresenta tricomas glandulares e não glandulares em ambas as faces da lâmina foliar, além de ramos e inflorescências, o que denota a produção de óleo essencial pela espécie. Algumas características presentes na lâmina foliar (lâmina cartácea, hipostomática e câmara subestomática, esclerofilia) pode ser um indicativo da endemia da espécie, além da característica de crescimento de indivíduos próximo às rochas no ambiente natural e o solo pobre em nutriente.

A fenologia foi afetada pelas variáveis climáticas em que a espécie estava sujeita. A fenofase de folhas maduras, sendo uma das fases mais importantes visando a disponibilidade de material vegetal para extração, demonstrou que a espécie não apresenta característica decídua, assim, com disponibilidade de coleta de folhas para a extração de óleo essencial por um período maior de tempo, além da possibilidade de cultivo no noroeste do Rio Grande do Sul.

O rendimento do óleo essencial de *Aloysia hatschbachii* apresentou-se satisfatório devido ao teor de óleo ser relativamente elevado, comparando a outras espécies. Devido a sua composição óleo essencial da espécie, estudos futuros serão promissores devido aos componentes majoritários, classificados como sesquiterpenos, que poderão apresentar atividade antimicrobiana, assim demonstrando uma das aplicabilidade em estudos futuros.

Este estudo contribuiu para o enriquecimento de informações valiosas da espécie *Aloysia hatschbachii*, que até então eram escassos, limitando-se apenas ao levantamento botânico e morfoanatomia foliar. Estudos sobre a espécie requerem atenção devido a sua potencialidade em produção com altos rendimentos do óleo essencial e seu potencial de aplicabilidade em diversas áreas.

8 REFERÊNCIAS

ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica.

In: **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. Lisboa: Faculdade de Ciências de Lisboa, p. 19-28, 2007. Disponível em:

<<http://cbv.fc.ul.pt/PAM/pdfsLivro/LiaAscensao.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2019.

AZEVEDO, G. C. V., et al. Sobrevivência de estacas de *Aloysia hatschbachii* confeccionadas de diferentes porções da planta. **10º Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, Brasília – DF. 2019.

BAHRAMSOLTANI, R., et al. *Aloysia citrodora* Palau (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 222, p. 34-51, 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.

CARNEIRO, N. S., et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017.

CASTRO, M. M.; LEITÃO-FILHO, H. F.; MONTEIRO, W. R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 20, n. 2, p. 163-174, 1997.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 376-376, 2014.

CRESPAM, P. C. **Estudos na família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 115 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FAHN, A. Functions and location of secretory tissues in plants and their possible evolutionary trends. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 50, n. sup1, p. 59-64, 2002.

FIALLO, V. R. F., et al. Estudios fenológicos en plantas medicinales XII. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 6, n. 3, p. 87-92, 2001.

FUENTES, V. Los estudios fenológicos en plantas medicinales en cuba. Experiencias en Cuba. **Resúmenes del seminario-taller provincial “La agrometeorología al servicio de la agricultura”**. La Habana, p. 6, 1992.

HEMALATHA, R., et al. Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 2, p. 1189-1198, 2016.

LI, Y., et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

KIM, T. H., et al. In vivo absorption and disposition of α -cedrene, a sesquiterpene constituent of cedarwood oil, in female and male rats. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 30, n. 2, p. 168-173, 2015.

LU-IRVING, P., et al. Resolving the genera *Aloysia* and *Acantholippia* within tribe Lantaneae (Verbenaceae), using chloroplast and nuclear sequences. **Systematic Botany**, v. 39, n. 2, p. 644-655, 2014.

MARKET RESEARCH REPORT. **Herbal medicine market size and forecast, by product (tablets & capsules, powders, extracts), by indication (digestive disorders, respiratory disorders blood disorders), and trend analysis, 2014-2024**. Disponível em: <
<https://www.hexaresearch.com/research-report/global-herbal-medicine-market>>. Acesso em: 05 dez. 2019.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 159 p. Tese (*Doctor Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MORONI, P.; O'LEARY, N. *Aloysia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15122>>. Acesso em: 02 Dez. 2019.

MORONI, P.; O'LEARY, N. *Aloysia* in: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15127>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

MÚLGURA, M. E. Verbenaceae. In: Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. II. 2007. 1-34. Disponível em:

<<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=hatschbachii&genero=Aloysia&espcod=179329>>. Acesso em: 09 out. 2019.

OKUGAWA, H., et al. Effect of α -santalol and β -santalol from sandalwood on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 119-126, 1995.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. São Paulo: Atheneu. 2009.

OMBITO, J. O., et al. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2014.

PORTMANN, E. et al. Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) Assessment of antioxidant capacity and DNA damage. **International Journal of Toxicology**, v.31, p.192-202, 2012.

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.

PROCHNOW, D., et al. Effect of meteorological elements on the content and composition of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton essential oil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 18, n. 2, p. 325-335, 2019.

- RAHMATULLAH, M., et al. Folk medicinal uses of Verbenaceae family plants in Bangladesh. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 5S, p. 53-65, 2011.
- RICCO, R. A., et al. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 5, p. 388-396, 2010.
- 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.
- SALIMENA, F. R. G., et al. Verbenaceae. *In*: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB246>>. Acesso: 01 Dez. 2019.
- SANTOS, A. C. B., et al. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 980-991, 2015.
- SATOU, T.; OGAWA, Y.; KOIKE, K. Relationship Between Emotional Behavior in Mice and the Concentration of (+)- α -Santalol in the Brain. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 8, p. 1246-1250, 2015.
- SEGECIN, S. Morfoanatomia das folhas cotiledonares, protofilo e metafilo de *Aloysia hatschbachii* Moldenke (Verbenaceae). **Akrópolis-Revista de Ciências Humanas da UNIPAR**, v. 3, n. 11, p. 21-29, 1995.
- SIEDO, S. J. **Systematics of *Aloysia* (Verbenaceae)**. 2006. 209 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) University of Texas, Austin, 2006.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2013.
- SVOBODA, K. P.; SVOBODA, T. G.; SYRED, A. D. Secretory structures of aromatic and medicinal plants. **Powys, UK, Microscopix**, 2000.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia e Vegetal**. 5. Ed., Porto Alegre: Artmed. 2013.

THIESEN, L. A. **Disponibilidade hídrica e sazonalidade sobre a fitomassa, anatomia foliar e produção de óleo essencial de cidrô**. 2019. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2019.

TOZIN, L. R. S.; SILVA, S. C. M.; ROGRIGUES, T. M. Non-glandular trichomes in Lamiaceae and Verbenaceae species: morphological and histochemical features indicate more than physical protection. **New Zealand Journal of Botany**, v. 54, n. 4, p. 446-457, 2016.

TOZIN, L. R. S.; SILVA, S. C. M.; ROGRIGUES, T. M. Non-glandular trichomes in Lamiaceae and Verbenaceae species: morphological and histochemical features indicate more than physical protection. **New Zealand Journal of Botany**, v. 54, n. 4, p. 446-457, 2016.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/886074>>. Acesso em: 02 dez. 2019.